



Immunothérapie anti-tumorale active par vecteur bactérien vivant atténué : mise au point de l'approche vaccinale "killed but metabolically active"

Xavier Chauchet

► To cite this version:

Xavier Chauchet. Immunothérapie anti-tumorale active par vecteur bactérien vivant atténué : mise au point de l'approche vaccinale "killed but metabolically active". Sciences pharmaceutiques. 2013. dumas-00822794

HAL Id: dumas-00822794

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00822794>

Submitted on 15 May 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : thesebum@ujf-grenoble.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2013

N°

**IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE ACTIVE
PAR VECTEUR BACTÉRIEN VIVANT ATTENUÉ :
MISE AU POINT DE L'APPROCHE VACCINALE
« *KILLED BUT METABOLICALLY ACTIVE* »**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES DE
PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMÉDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de
THÈSE PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ÉTAT

Xavier CHAUCHET

Né le 9 Juin 1984 à Haguenau (67)

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 7 mai 2013

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury : Professeur Michel SEVE

Directeur de thèse : Professeur Bertrand TOUSSAINT

Docteur Anne DOLEANS-JORDHEIM

Docteur Anne-Sophie GAUCHEZ

Professeur Jean-Luc LENORMAND

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2013

N°

**IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE ACTIVE
PAR VECTEUR BACTÉRIEN VIVANT ATTENUÉ :
MISE AU POINT DE L'APPROCHE VACCINALE
« KILLED BUT METABOLICALLY ACTIVE »**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES DE
PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMÉDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de
THÈSE PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ÉTAT

Xavier CHAUCHET

Né le 9 Juin 1984 à Haguenau (67)

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 7 mai 2013

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury : Professeur Michel SEVE

Directeur de thèse : Professeur Bertrand TOUSSAINT

Docteur Anne DOLEANS-JORDHEIM

Docteur Anne-Sophie GAUCHEZ

Professeur Jean-Luc LENORMAND

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2012-2013

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=11)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I.)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I.) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEUR EMERITE (n=1)

GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)
---------	-------	--

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=31)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)

Dernière mise à jour : 24/10/2012

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I/MCU-PH)

PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)

FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)
DON	Martin	Laboratoire TIMC-IMAG

PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
----------	---------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

SUEUR	Charlotte	Virologie (U.V.H.C.I)
VAN NOOLEN	Laetitia	Biochimie Toxicologie (HP2-DBTP-BGM)

ATER (n= 6)

DAYDE David	ATER	Parasitologie Mycologie (J.R)
FAVIER Mathieu	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
HADDAD-AMAMOU Anis	ATER	Laboratoire de Pharmacie Galénique
HENRI Marion	ATER	Physiologie – Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)
REGENT-KLOEKNER Myriam	ATER	Biochimie (LECA-UJF)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=9)

CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
LECERF-SHMIDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Pharmacochimie (DPM)
BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire HP2 (JR)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 24/10/2012

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Benoît POLACK, directeur du laboratoire TheREx

Je vous remercie de m'avoir accueilli dans le laboratoire TheREx et je tiens à souligner votre disponibilité, votre soutien, ainsi que votre participation active aux « événements TheREx ». Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Aux membres du jury qui ont accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail :

A Monsieur le Professeur Michel SEVE

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse, malgré votre emploi du temps très chargé. Je vous en remercie et j'espère que vous apprécierez ce travail.

A Mesdames les Docteurs Anne-Sophie GAUCHEZ et Anne DOLEANS-JORDHEIM

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de votre réactivité. J'espère que cette thèse vous plaira et que nous pourrions en discuter ensemble.

A Monsieur le Professeur Jean-Luc LENORMAND (DJ J2L)

Jean-Luc, je te remercie vivement d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de me faire l'honneur de juger mon travail. Je souhaite aussi souligner ici la qualité de ton enseignement, dont j'ai pu bénéficier durant mon master, ainsi que tes qualités humaines, qui font de toi une personne vraiment sympathique.

A Monsieur le Professeur Bertrand TOUSSAINT, Directeur de thèse

Bertrand, il m'est difficile de résumer en quelques lignes tout ce que tu m'as apporté et permis de faire pendant mon internat. Tu as accepté de m'accueillir dans l'équipe BacVac en 2009 alors que je n'avais jamais utilisé une pipette et que j'étais en pleine recherche de vocation... En plus de tes qualités humaines, ta disponibilité, ta patience et la qualité de ton encadrement scientifique ont permis que cette thèse se déroule dans les meilleures conditions. Je te remercie sincèrement de m'avoir formé, fait confiance et soutenu dans tous les projets que j'ai pu entreprendre ces 4 dernières années.

A Madame le Docteur Audrey LE GOUELLEC-LE PISSART

Je te remercie sincèrement de m'avoir guidé dans mes premiers pas à la paillasse et d'avoir encadré mes travaux de master 2 dans le laboratoire. J'ai appris énormément de chose à tes côtés, et j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi. Ton dynamisme communicatif, ton optimisme et ta perpétuelle motivation m'ont donné goût à la recherche, même quand on ne trouvait pas grand-chose... Tu as poursuivi brillamment ce travail après mon départ et tu as pu valoriser tout ce qui a été effectué dans le cadre de cette thèse. Je t'en suis particulièrement reconnaissant.

A Madame le Docteur Marie-Claire DAGHER

Je te remercie vivement d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit et de l'avoir corrigé minutieusement. Si tout le monde comprend cette thèse, que personne ne trouve de fautes d'orthographe, de syntaxe, ou de ponctuation, pas de doute ce sera grâce à toi MC !

Merci aussi pour tes qualités de « coach » dans l'organisation de la vie du laboratoire.

A Monsieur le Docteur David LAURIN

David, je tiens à te remercier pour avoir apporté ton expertise d'immunologiste dans ce travail. Je tiens à souligner ta rigueur scientifique, ta disponibilité (pour le FACS jusqu'à minuit passé...) et la qualité de ta formation. J'espère qu'on aura encore l'occasion de travailler ensemble avant la fin de ma thèse de sciences.

A Monsieur le Docteur Hichem CHACKER, Madame le Docteur Yan WANG et Monsieur le Docteur Olivier EPAULARD pour m'avoir accompagné dans mes débuts au laboratoire et d'avoir eu la patience de répondre à mes nombreuses questions.

A Roberta, Yoyo, David, Landry, Xavier, Thom, Charlotte, Martine, Fred, Lavinia et tous les gens rencontrés ou croisés à TheREx

La bonne ambiance qui règne au laboratoire fait que ça a été et que c'est toujours un réel plaisir de venir travailler à vos côtés.

Aux membres d'APCure Anne-Laure, Julien, Pauline

Je pense qu'on a beaucoup de choses à se raconter, à échanger... J'espère qu'on aura l'occasion de travailler ensemble dans les mois qui viennent. Dans tous les cas vos questions

sont toujours les bienvenues ! Merci aussi à vous pour votre bonne humeur et votre sympathie.

A tout le personnel rencontré au CHU de Grenoble, notamment en Médecine Nucléaire (Merci à toi Marie-Do !), en Médecine Interne, en Stérilisation, en Biochimie et durant les gardes.

A mes amis et collègues co-internes rencontrés à Grenoble

'Sont vraiment sympas les gens ici !

A mes amis belfortains, strasbourgeois, parisiens, lausannois,...

Toujours bon de vous revoir !

A mes parents,

Merci de m'avoir toujours soutenu, à tous les niveaux, et de m'avoir permis de « faire mon petit bonhomme de chemin », je vous en serai toujours reconnaissant. Cette thèse est l'aboutissement de mes études et je tiens donc à vous la dédier. Merci d'avoir aussi pris le temps de relire et de corriger mon manuscrit.

A mon grand frère Doc' lenlen qui compte beaucoup pour moi, **sa femme Anne-Catherine, ma filleul Charlotte et...** la famille s'agrandit.

A ma p'tite sœur Blan qui est devenue une femme **et son copain Amir,**

Alors on vous voit quand ?

A mes Grands-Parents,

A Annick,

Aux familles Véran et Sauvage

Il paraît qu'on garde le meilleur pour la fin... Alors à toi **ma P'tite Nancy**, qui partage ma vie, me surprend toujours avec ses petites attentions, et m'a transmis sa « soif de découvertes »...

On va être bien chez nous...

TABLE DES MATIÈRES

INDEX DES FIGURES	12
INDEX DES TABLEAUX	13
LISTE DES ABREVIATIONS	14
PROBLEMATIQUE.....	16
INTRODUCTION	20
A. Activation et régulation de l'immunité antitumorale	21
1. La cellule dendritique : chef d'orchestre de la réponse immunitaire	21
2. Orientation de la réponse T et régulation	26
3. Induire une immunité antitumorale : un challenge multi-étapes ?	32
B. Message antigénique	33
1. Antigènes multiples, non définis	34
2. Antigènes définis	34
3. La quête du « bon message antigénique».....	36
C. Stratégies d'immunothérapie des cancers.....	41
1. Antigènes tumoraux non vectorisés.....	41
2. Cellules dendritiques chargées en antigènes <i>ex vivo</i> puis réinjectées.....	42
3. Utilisation de vecteurs.....	43
D. Immunothérapie antitumorale et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
2. Travaux précédemment menés au laboratoire	53
E. Sécurisation de la souche vaccinale	57
1. Quels sont les besoins en termes d'atténuation ?	57
2. Le concept des bactéries « Killed But Metabolically Active »	58
3. Objectifs du travail.....	60
MATÉRIELS ET MÉTHODES	61
A. Souches bactériennes et plasmides	62
B. Manipulation des bactéries.....	63
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :.....	63
2. <i>Escherichia coli</i>	64
C. Mutagenèse par échange allélique basée sur le système de recombinaison <i>cre-lox</i> ...	64
D. Mise au point du traitement photochimique (PCT) pour obtenir la souche <i>P. aeruginosa</i> CHA-OST KBMA.....	69
E. Activité métabolique de CHA-OST KBMA : test de sécrétion d'un antigène vaccinal par le système de sécrétion de type III	69

1. Sécrétion de la protéine de fusion S54-PADRE-OVA par le SSTT	70
2. Etude du surnageant par SDS-PAGE	70
F. Test de présentation des CD injectées par l'antigène S54-PADRE-OVA	71
G. Test de cytotoxicité de la souche KBMA sur les macrophages murins J774.....	72
H. Etude de toxicité <i>in vivo</i> chez la souris.....	72
I. Détermination par immunomonitoring de la dose vaccinale efficace <i>in vivo</i> en modèle murin.....	73
1. Préparation des doses vaccinales.....	74
2. Manipulation des souris	75
RESULTATS	76
A. Le traitement photochimique bloque la réplication du mutant CHA-OST Δ uvrA.....	77
1. Elaboration des mutants CHA-OST Δ uvrA et Δ uvrAB	77
2. Mise au point du traitement photochimique.....	78
B. Le système de sécrétion de type III de la souche reste fonctionnel après traitement photochimique	80
1. Sécrétion de l'antigène vaccinal S54-PADRE-OVA par le SSTT.....	80
C. Le vecteur CHA-OST KBMA est moins toxique pour les cellules.....	83
1. Cytotoxicité de la souche CHA-OST KBMA PEA13S54-PADRE-OVA vis-à-vis des macrophages J774 :	83
D. CHA-OST KBMA active les cellules dendritiques murines et stimule une réponse T CD8+ spécifique <i>in vitro</i>	84
E. CHA-OST KBMA est moins toxique <i>in vivo</i> en modèle murin	86
F. La vaccination avec le vecteur CHA-OST KBMA induit une immunité cellulaire spécifique T CD8+ anti-OVA <i>in vivo</i> en modèle murin	87
DISCUSSION.....	89
A. Généralités	90
B. Mise au point du traitement photochimique	91
C. Fonctionnalité du système de sécrétion de type 3 après PCT	92
D. Toxicité du vecteur CHA-OST KBMA.....	93
E. Réponse immunitaire <i>in vitro</i>	93
F. Réponse immunitaire <i>in vivo</i>	94
G. Perspectives.....	94
CONCLUSION	96
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99
ANNEXES	105

INDEX DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Vision actuelle de la segmentation des domaines de l'immunothérapie.....	17
<u>Figure 2</u> : Les cellules dendritiques immatures induisent la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de l'antigène	22
<u>Figure 3</u> : Les cellules dendritiques matures induisent l'immunité	26
<u>Figure 4</u> : Différentiation des lymphocytes T CD4+ helper	29
<u>Figure 5</u> : Mécanismes simplifiés de stimulation et d'inhibition des lymphocytes T et thérapies ciblant ces voies (adapté de Sharma <i>et al.</i>)	31
<u>Figure 6</u> : Activation et régulation de l'immunité antitumorale	33
<u>Figure 7</u> : Hiérarchisation des antigènes de tumeurs effectuée à partir des critères prédéfinis par les experts.	39
<u>Figure 8</u> : Classification des antigènes de tumeurs après exclusion des critères d'efficacité thérapeutique et d'immunogénicité.....	40
<u>Figure 9</u> : Approche vaccinale basée sur l'éducation <i>ex vivo</i> des cellules dendritiques puis la réinjection afin d'induire l'immunité antitumorale	43
<u>Figure 10</u> : Système de sécrétion de type III de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
<u>Figure 11</u> : Plasmide pEAI3 S54.	54
<u>Figure 12</u> : Concept de l'immunothérapie antitumorale utilisant le SSTT de <i>P. aeruginosa</i> ...	56
<u>Figure 13</u> : Principe du traitement photochimique (d'après Cerus Corporation. www.cerus.com)	58
<u>Figure 14</u> : Plasmide de mutagenèse pEX100Tlink.....	65
<u>Figure 15</u> : Mutagenèse par échange allélique et élimination du marqueur de sélection.....	68
<u>Figure 16</u> : Principe du test ELISpot.....	73
<u>Figure 17</u> : Analyse génotypique du mutant CHA-OST Δ uvrA.....	77
<u>Figure 18</u> : Viabilité des bactéries après PCT en fonction de la concentration d'amotosalène pour les souches CHA-OST et CHA-OST Δ uvrA.	78
<u>Figure 19</u> : Viabilité des bactéries après PCT en fonction de l'énergie d'exposition aux UVA pour les souches CHA-OST et CHA-OST Δ uvrA.....	79

<u>Figure 20</u> : Profil de sécrétion de la souche CHA-OST Δ uvrA pEAI554-PADRE-OVA	81
<u>Figure 21</u> : Profil de sécrétion de la souche CHA-OST KBMA pEAI3S54-PADRE-OVA à différents PCT.....	81
<u>Figure 22</u> : Analyse des surnageants de culture de la souche CHA-OST Δ uvrA pEAI554-PADRE-OVA avec ou sans activation de la sécrétion, à différents PCT	82
<u>Figure 23</u> : Mortalité des macrophages J774 après 3h de contact avec la souche CHA-OST Δ uvrA pEAI554-PADRE-OVA (MOI 5:1) traitée ou non par PCT.....	83
<u>Figure 24</u> : Présentation par le CMH I d'un peptide issu de l'ovalbumine par les BMDC ayant interagi avec la souche CHA-OST KBMA PEAI3S54-PADRE-OVA exposée à différents PCT (différentes concentrations d'amotosalène)	85
<u>Figure 25</u> : Quantification par ELISpot de la réponse spécifique T CD8+ cytotoxique induite par différentes conditions de vaccination.....	87

INDEX DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Caractéristiques de l'antigène de tumeur idéal	37
<u>Tableau 2</u> : Importance relative des différents critères définissant un antigène de tumeur idéal	37
<u>Tableau 3</u> : Immunothérapies antitumorales ayant obtenu une AMM ou en études cliniques de phase II ou III	47
<u>Tableau 4</u> : Inactivation des bactéries par Intercept Blood System®	59
<u>Tableau 5</u> : Souches bactériennes et plasmides utilisés dans ce travail	62
<u>Tableau 6</u> : Amorces pour l'amplification des séquences utilisées pour la délétion des gènes <i>uvrA</i> et <i>uvrB</i> et pour la vérification des mutants obtenus	66
<u>Tableau 7</u> : Répartition des souris pour le premier test ELISpot	74
<u>Tableau 8</u> : Répartition des souris pour le second test ELISpot.....	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament
ARN : Acide Ribonucléique
BMDC : *Bone Marrow-derived Dendritic Cells* (cellules dendritiques dérivées de la moëlle osseuse)
Cb : Carbenicilline
CD : Cellule Dendritique
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPAg : Cellule Présentatrice d'Antigène
CPRG : Chlorophenolred- β -D-Galactopyranoside
CTL : *Cytotoxic T Lymphocyte* (lymphocyte T cytotoxique)
CTLA-4 : *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique)
DO : Densité Optique
EDTA : Ethylène Diamine Tétraacétate
ELISpot: *Enzyme-Linked ImmunoSpot*
EMA : *European Medicines Agency*
FDA : *Food and Drug Administration*
Gm : Gentamicine
GM-CSF : *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* (cytokine immunostimulante)
H2K^b : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I de la souris C57BL/6
IFN α : Interferon α
IL : Interleukine
IPTG : Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside
KBMA : *Killed But Metabolically Active* (tué mais métaboliquement actif)
kDa : kiloDalton
LB : milieu de culture Luria & Bertani
LDH : Lactate Deshydrogénase
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocytes T
MOI : *Multiplicity Of Infection* (nombre de bactérie(s) par cellule eucaryote)
O/D : *Overday* (sur la journée)
O/N : *Overnight* (sur la nuit)
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
pb : paires de bases
PCR : *Polymerase Chain Reaction* (réaction d'amplification en chaîne)
PCT : *Photochemical Treatment* (traitement photochimique)
PD1 : *Programmed cell Death protein 1*

PIA : *Pseudomonas Isolation Agar*
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE : *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*
SSTT : Système de Sécrétion de Type III
SVF : Sérum de Veau Fœtal
Tc : Tétracycline
TCA : Acide Trichloracétique
TCR : *T cell receptor*, récepteur des cellules T
TLR : *Toll-Like Receptor* (récepteurs de la famille Toll)
TNF : *Tumor Necrosis Factor* (facteur de nécrose tumorale)
X^r : résistance à l'antibiotique X
X^s : sensible à l'antibiotique X

PROBLEMATIQUE

Malgré la mise en place du dépistage, l'amélioration des techniques diagnostiques et le développement de thérapies innovantes, les cancers demeurent une cause majeure de mortalité dans le monde. Les derniers chiffres publiés par l'OMS montrent que les décès par cancer sont supérieurs à ceux du SIDA, de la tuberculose et du paludisme réunis. Pour l'année 2008, 7,6 millions de décès ont été relevés (soit 13% de la mortalité mondiale) et, d'après les projections publiées dans la base de données Globocan 2008, plus de 13 millions de personnes décèderont d'un cancer en 2030 (1).

Les stratégies de traitement conventionnelles (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie) restent des piliers dans la prise en charge ; il faut d'ailleurs préciser que la chirurgie est dans beaucoup de cas le seul et unique traitement curatif à ce jour, mais nécessite une prise en charge précoce.

L'évolution de nos connaissances sur la physiopathologie des tumeurs, et l'essor des biotechnologies, ont rendu possible le développement des thérapies ciblées (inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase, anticorps monoclonaux) et des traitements personnalisés. Parmi ces approches prometteuses, l'immunothérapie anti-tumorale a bénéficié d'avancées majeures ces 20 dernières années (2). Elle consiste à moduler le système immunitaire, ou utiliser ses éléments, pour induire, amplifier ou restaurer une réponse anti-tumorale. Deux axes principaux ont été explorés : l'immunothérapie anti-tumorale *active*, qui mobilise ou renforce les ressources du système immunitaire (vaccins, cytokines), et l'immunothérapie anti-tumorale *passive* (ou *adoptive*), qui apporte de manière exogène les effecteurs immunitaires humoraux (anticorps monoclonaux) ou cellulaires (transfert de lymphocytes T activés spécifiques de la tumeur).

L'immunothérapie anti-tumorale active peut être subdivisée en *approches spécifiques*, consistant à générer une réponse immune de l'hôte vis-à-vis d'antigènes exprimés par la tumeur - ou *non-spécifiques*, ayant pour but d'amplifier une réponse immune existante par l'administration d'immunomodulateurs (figure 1).

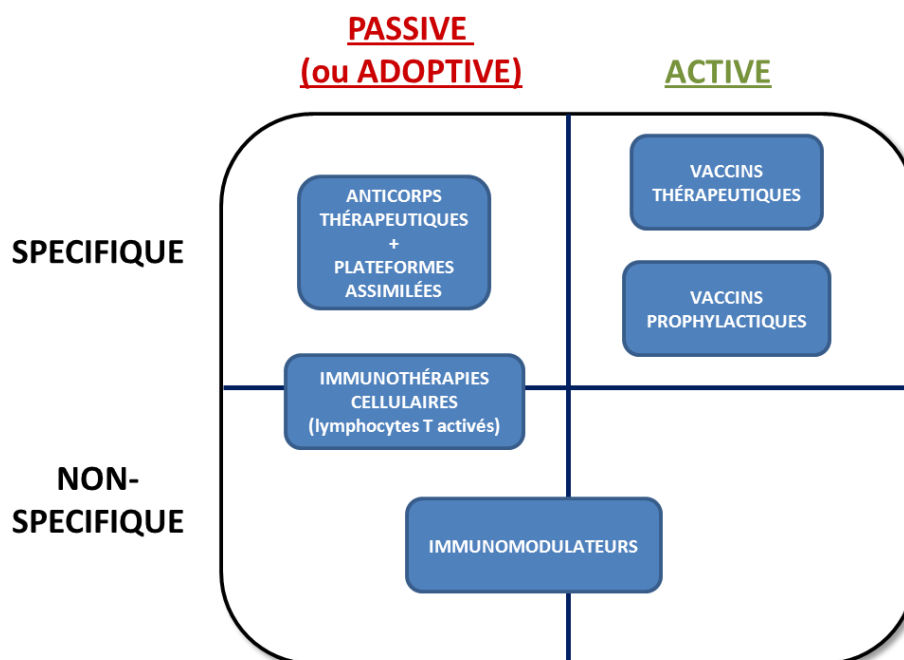


Figure 1 : Vision actuelle de la segmentation des domaines de l'immunothérapie (adaptée du rapport de l'étude « Immunothérapie 2025 » des Entreprises du Médicaments (LEEM))

Le principe de vaccination antitumorale a été mis en avant par les travaux du chirurgien William B. COLEY (1893), qui a démontré les bénéfices de l'inoculation de bouillons de bactéries mortes, dans des cas de tumeurs inopérables (« Toxine de Coley » ou « Vaccin de Coley ») (3). L'injection *in situ* de bactéries tuées entraîne une réponse indirecte du système immunitaire contre la tumeur. On utilise encore à ce jour des instillations intravésicales du bacille de Calmette et Guérin (BCG) dans le traitement adjuvant post-chirurgical du cancer de la vessie.

Les progrès réalisés ensuite en immunologie ont permis de mieux caractériser les éléments nécessaires à l'obtention d'une réponse immunitaire spécifique et efficace vis-à-vis de la tumeur : 1) présence d'un signal de danger adéquat, favorisant l'orientation de la réponse immunitaire vers une réponse cellulaire ; 2) identification et choix d'antigènes associés ou spécifiques de la tumeur (message antigénique) ; 3) délivrance des antigènes tumoraux au système immunitaire de manière adaptée.

Ces considérations prises en compte, plusieurs stratégies d'immunothérapie antitumorale active spécifique dites *ex vivo* (prélèvement et réinjection de cellules dendritiques activées) ou *in vivo* (lysats tumoraux, vecteurs d'antigènes variés, etc...) ont été mises au point. De nombreuses études cliniques et précliniques sont effectuées avec ces différentes approches

et un premier vaccin thérapeutique (sipuleucel-T, Provenge®) a obtenu une autorisation de mise sur le marché en 2010 pour le traitement du cancer de la prostate métastatique et résistant à l'hormonothérapie. Malgré un bénéfice limité pour le patient, nous pouvons nous réjouir de cette preuve de concept qui ouvre clairement la voie au développement de l'immunothérapie active dans le traitement du cancer (4,5). Plusieurs écueils sont encore à surmonter et des recherches sont menées afin de mieux comprendre le rôle du système immunitaire dans les différentes étapes du développement tumoral. Il semble qu'il soit en mesure de détruire la tumeur dans un premier temps mais qu'il favorise ensuite la progression tumorale en sélectionnant des variants cellulaires résistants, à l'origine de l'échappement de la tumeur. Cette sélection immunitaire (*cancer immunoediting*) est particulièrement à prendre en compte dans le cadre de l'immunothérapie antitumorale (6).

Un autre défi important pour développer un vaccin efficace est d'obtenir un message antigénique fort et limité à la tumeur. Cependant les antigènes associés aux tumeurs sont dans la majorité des cas des protéines du soi qui peinent à induire une réponse immune, et ce, en raison des mécanismes d'immunosuppression mis en jeu dans la tolérance du soi. Cette rupture de tolérance vis-à-vis de l'antigène peut être obtenue par l'utilisation de vecteurs appropriés, capables à la fois, de stimuler la réponse immunitaire et de lui délivrer le message antigénique.

Le laboratoire TheREx a mis au point une approche originale d'immunothérapie active capable de répondre à cette problématique. Elle consiste à injecter une bactérie atténuée (*Pseudomonas aeruginosa*) et modifiée pour délivrer des antigènes de tumeur au système immunitaire. Comme la plupart des bactéries Gram négatif, *P. aeruginosa* dispose d'un système de sécrétion de type III, permettant l'injection de toxines directement dans le cytoplasme de cellules eucaryotes, et jouant un rôle majeur dans la virulence de la bactérie. Ce système a été génétiquement modifié au laboratoire et asservi pour délivrer, non plus des toxines, mais des protéines antigéniques d'intérêt, directement dans les cellules cibles (cellules présentatrices d'antigènes majoritairement).

Ce vecteur bactérien est en développement depuis presque 10 ans et a donné des résultats encourageants en modèle préclinique murin de mélanome et de glioblastome. Cependant, le principal obstacle au développement futur de ce traitement réside dans la toxicité inhérente à la bactérie. Un travail important a déjà été mené par notre équipe afin de diminuer le risque lié à l'utilisation d'un vecteur bactérien vivant, mais l'innocuité de souches atténuées

injectées à l'homme est très discutée. Il faut par ailleurs préciser que les patients malades peuvent être immunodéprimés en raison de l'administration de traitements lourds et du développement tumoral avancé. Les risques d'infection et de dissémination suite à l'injection de micro-organismes atténués paraissent donc plus nombreux que dans le cas d'une administration de vaccins prophylactiques chez des patients sains.

L'objectif de ce travail est de mettre au point et de valider une méthode d'atténuation innovante appelée « Killed But Metabolically Active Vaccine » (KBMA) répondant au besoin du laboratoire en termes de « sécurisation » du vecteur bactérien d'immunothérapie.

Dans une première partie, nous décrirons les principes fondamentaux menant au développement d'une immunothérapie antitumorale active efficace. Nous présenterons ensuite le vecteur d'immunothérapie utilisé au laboratoire, ainsi que les travaux préalablement effectués, notamment sur l'atténuation de la virulence du vecteur bactérien. Après un chapitre Matériel et Méthodes, nous présenterons les premiers résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* en modèle murin suite à l'élaboration d'une souche KBMA *P. aeruginosa*. Enfin nous discuterons des résultats, avant de conclure ce travail.

INTRODUCTION

A. Activation et régulation de l'immunité antitumorale (7)

1. La cellule dendritique : chef d'orchestre de la réponse immunitaire

La mission du système immunitaire est de collecter des informations, les intégrer et déclencher ou non une réponse adaptée. Les cellules présentatrices d'antigènes, et particulièrement la cellule dendritique, jouent un rôle central dans l'initiation et le contrôle de cette réponse. Il est donc fondamental de comprendre la biologie des cellules dendritiques (CD) et la manière dont elles régulent l'immunité innée et adaptative, spécialement dans le contexte de l'immunité antitumorale (8–10).

➤ Origine et développement des cellules dendritiques (11)

Les CD sont des cellules dérivées de la moëlle osseuse que l'on retrouve dans tous les tissus périphériques. A l'état immature, elles possèdent une très forte capacité de phagocytose et d'endocytose leur permettant « d'échantillonner l'environnement » et de transmettre de manière efficace les informations recueillies aux cellules du système immunitaire adaptatif (lymphocytes B et T) ; pour cette raison, on les nomme couramment « **cellules présentatrices d'antigènes professionnelles** ».

On distingue 2 classes majeures de CD chez la souris et l'humain : les cellules dendritiques myéloïdes (CDm ou CD conventionnelles) et les cellules dendritiques plasmocytoïdes (CDp). Les CDp circulent dans le sang et sont capables de sécréter de grandes quantités d'IFN α en présence de particules virales, leur conférant un rôle prépondérant dans la réponse immune aux infections virales (12). Nous nous intéresserons principalement dans ce travail aux CDm que l'on retrouve sous la forme de cellules de Langherans (peau) ou de CD interstitielles (autres tissus) (9,13).

Les CD immatures recrutées au niveau des tissus possèdent des propriétés uniques:

- captation d'antigènes élevée

- faible expression membranaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), mais forte accumulation de molécules du CMH II dans le compartiment endosome-lysosome
- expression intermédiaire de molécules de costimulation des lymphocytes T (CD80/CD86) et faible sécrétion de cytokines
- expression de récepteurs de chemokines favorisant le « homing », c'est-à-dire la localisation tissulaire majoritaire des CD (et peu au niveau des organes lymphoïdes secondaires)

Les CD immatures peuvent présenter des auto-antigènes (ou antigènes du soi) aux LT et induire une tolérance immune soit par délétion ou anergie des LT soit en favorisant l'expansion de LT régulateurs (T reg) (Figure 2). Seule l'exposition à des signaux de maturation va rendre possible l'acquisition de nouvelles fonctions effectrices.

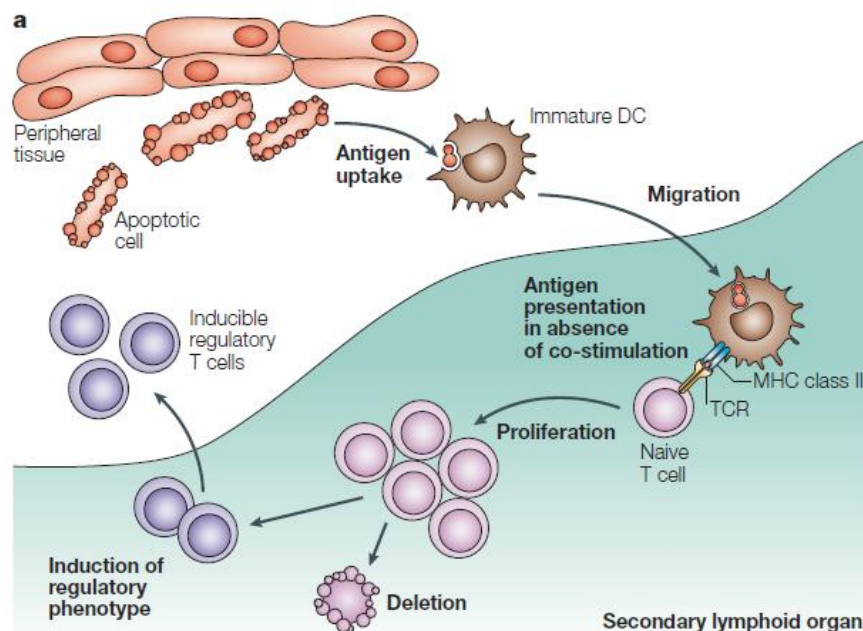


Figure 2 : Les cellules dendritiques immatures induisent la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de l'antigène (9). Les CD « échantillonnent » en permanence l'environnement, capturent des antigènes et migrent, en faible nombre, vers les organes lymphoïdes secondaires. Sans réaction inflammatoire au site de capture, les CD restent à l'état immature et présentent les antigènes aux lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires. L'absence de signaux de costimulation conduit à la fois à une délétion des lymphocytes T et à l'activation de lymphocytes T régulateurs inducibles.

➤ **Le signal de danger entraîne l'activation des cellules dendritiques et facilite leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires**

La CD possède un panel de senseurs moléculaires spécifiques, nommés *pattern recognition receptors* (PRRs), capables de transduire les signaux de danger perçus. Les PRRs comprennent les familles des *Toll-like receptors* (TLRs) membranaires ou intracellulaires, des *C-type lectin receptors* (CLRs) membranaires ainsi que des *NOD-like receptors* (NLRs) intracellulaires. Les TLRs sont particulièrement bien caractérisés (14) et sont présents chez de nombreuses espèces. Chez l'homme, ils sont au nombre de 11 et sont exprimés en particulier par les cellules présentatrices d'antigènes, dont les macrophages, les polynucléaires et les cellules dendritiques. L'interaction des TLRs avec leurs ligands induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B et de la voie de signalisation des MAP kinases, stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-12, TNF α) et l'expression des molécules de costimulation (15,16).

La stimulation des TLRs (et plus généralement des PRRs) est donc une voie d'activation clé de la cellule dendritique. Elle va permettre la mise en place de l'immunité innée, en stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, et de l'immunité adaptative, en entraînant l'expression des molécules de costimulation (17). Notons que d'autres signaux permettent d'activer les CD dont le ligand CD40 (CD40L, ligand du récepteur CD40 des CD), molécule de costimulation retrouvée sur les lymphocytes T helper, et diverses cytokines.

Les ligands des PRRs sont soit issus de pathogènes, regroupés en *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), soit issus de dégradation cellulaire endogène (ADN, protéines cytoplasmiques ou nucléaires), rassemblés en *danger-associated molecular pattern molecules* (DAMPs) (17,18).

Certains ligands des TLRs ont été identifiés, en voici quelques exemples :

- TLR2 reconnaît une variété de PAMPs (les lipoprotéines bactériennes, les peptidoglycanes et les acides lipotéichoïques) et de DAMPs dont la protéine HMGB1 associée à la chromatine (*high-mobility group box 1*) et la famille des *Heat Shock Proteins* (HSP), impliquée dans le repliement des protéines.
- TLR3 reconnaît des ARN double-brins d'origine virale ou parasitaire
- TLR4 est activé par les LPS bactériens, les glycoprotéines virales ainsi que les protéines HMGB1 et HSP.

- TLR5 reconnaît la flagelline, protéine structurale majeure des bactéries flagellées.
- TLR9 reconnaît les motifs non-méthylés d'ADN CpG des bactéries ou des virus ainsi que l'ADN endogène relargué par la cellule.

C'est seulement après avoir intégré ces signaux de maturation (= signaux de danger), conjointement à la capture d'antigènes, que la CD pourra initier une réaction immune adaptative, et ce, grâce à l'acquisition de propriétés nouvelles :

- baisse d'activité de la capture d'antigènes
- augmentation de l'expression membranaire des molécules du CMH et des molécules de costimulation des lymphocytes T
- capacité à sécréter des cytokines immunostimulantes (en particulier l'IL-12)
- expression de multiples récepteurs de chémokines (dont CCR7, CCR4 et CXCR4) favorisant la migration vers les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, etc...) (13).

En fonction du signal de danger reçu (qui est fonction du type de PRRs activé) et de la réaction inflammatoire environnante (cytokines en présence), plusieurs phénotypes de CD matures peuvent être obtenus, et orienter la réponse immunitaire différemment (19,20).

Nous verrons ultérieurement que la présence d'un signal de danger adapté favorisant l'activation des CD, en présence des antigènes de tumeur, est un élément indispensable pour le développement d'une immunité antitumorale cellulaire adaptative.

➤ Interaction CD- lymphocytes T

D'une manière générale, les CD activées migrent par les vaisseaux lymphatiques vers les organes lymphoïdes secondaires et présentent les peptides-épitopes aux lymphocytes T naïfs, via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Les antigènes présents dans le cytoplasme des cellules dendritiques sont digérés en peptides par le protéasome, puis sont ensuite transportés par les molécules TAP (*Transporter Associated with antigen Processing*) vers le réticulum endoplasmique (RE). Les peptides sont alors associés aux molécules du CMH. Le complexe CMH-peptide migre finalement via l'appareil de Golgi pour être exprimé à la surface de la membrane plasmique, où il va être visible des lymphocytes T.

Les peptides présentés par le CMH I proviennent essentiellement du compartiment intracellulaire : il s'agit soit de peptides du soi, soit de peptides provenant de virus ou de bactéries à l'origine d'infections intracellulaires. Le CMH II présente des peptides d'origine exogène, phagocytés par la cellule, et ayant fait l'objet d'une dégradation dans le compartiment lysosomal (21). Toutefois, certains antigènes (du soi ou du non soi) d'origine exogène peuvent être présentés par le CMH I : il s'agit du mécanisme de cross-présentation. Ce terme désigne une voie de processing supplémentaire, propre à certains phénotypes de cellules dendritiques, qui permet à des antigènes internalisés d'être transportés et assemblés avec les molécules du CMH I (22).

Les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ naïfs vont interagir avec les CD via une reconnaissance CMH-peptide – récepteur du lymphocyte T (TCR). Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs vont reconnaître les molécules de CMH II couplées aux peptides alors que les lymphocytes T CD8⁺ naïfs vont s'associer aux complexes CMH I - peptides. En présence de molécules de costimulation (CD80/CD86 se liant à CD28) et de cytokines sécrétées, les lymphocytes T pourront se différencier en lymphocytes T effecteurs spécifiques de l'antigène (figure 3). L'ensemble de ces interactions constitue la « synapse immunologique » qui va conditionner la suite de la réponse immunitaire.

Comme nous l'avons vu précédemment l'absence ou la faiblesse de la costimulation (état immature de la CD) entraîne le lymphocyte T vers un état d'anergie. Ce phénomène est nécessaire afin que les antigènes du soi ou du non soi collectés et présentés en l'absence de signal de danger ne soient pas à l'origine d'une réaction immunitaire non appropriée. Cette situation est valable dans le cas des antigènes tumoraux, appartenant majoritairement au soi ou au soi modifié. Nous verrons qu'il sera nécessaire de rompre cette tolérance par l'apport d'un signal de danger fort, conjointement au message antigénique, pour générer une réponse immunitaire dirigée contre ces antigènes.

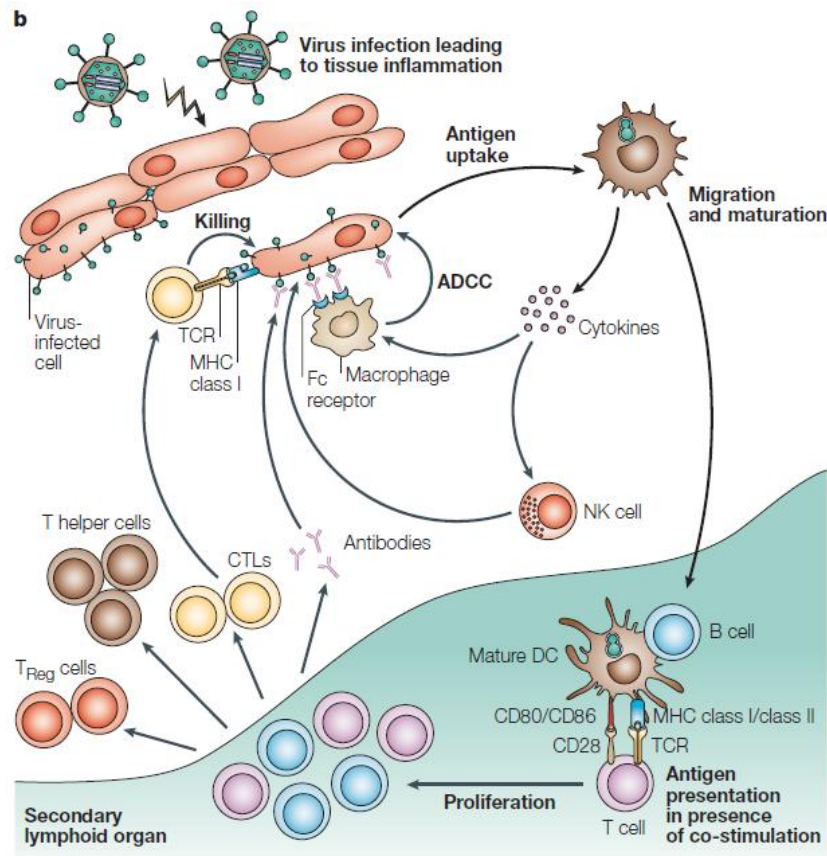


Figure 3 : Les cellules dendritiques matures induisent l'immunité (9). L'inflammation (exemple d'une infection virale) au niveau des tissus induit la maturation des cellules dendritiques et leur migration en grand nombre vers les organes lymphoïdes secondaires. Les CD matures expriment les complexes CMH-peptide à leur surface ainsi que des molécules de costimulation appropriées. Cela permet la pré-activation des lymphocytes T CD4+ helper et des T CD8+ cytotoxiques (CTL), l'activation des lymphocytes B et l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Pour contrôler la réponse immunitaire, les lymphocytes T régulateurs (CD4+ CD25+) sont aussi activés. ADCC : *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* ; NK : *Natural Killer* ; TCR : *T-cell receptor*

2. Orientation de la réponse T et régulation

➤ Polarisation des lymphocytes T CD4+

Contrairement aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4+ peut produire plusieurs types de réponses qui vont, soit favoriser la réponse immunitaire en l'amplifiant, soit l'inhiber. L'orientation de la réponse est liée au profil cytokinique des CD (plus largement des cellules présentatrices d'antigènes), dépendant de la manière dont elles ont été activées dans les tissus ou les organes lymphoïdes secondaires.

On distingue actuellement 4 réponses de types CD4⁺ T helper (Th1, Th2, Th17 et plus récemment T_{FH}) et une réponse T régulatrice (Treg) (23,24) ; nous nous limiterons dans cette partie à une rapide description de ces voies de différenciation :

- **La réponse de type Th1** (orientation vers une **immunité cellulaire**) est recherchée pour le développement d'une immunité antitumorale. Elle est caractérisée par une sécrétion d'IFN γ et de TNF- β favorisant la différenciation et l'expansion clonale des lymphocytes TCD8⁺ en lymphocytes T cytotoxiques (CTL). L'IFN γ et le TNF- β activent les macrophages et déclenchent le recrutement de leucocytes au site inflammatoire. Cette réponse est impliquée dans le développement d'une réponse T mémoire favorable à une protection durable.

- **La réponse de type Th2** (orientation vers une **immunité humorale**) se définit par une sécrétion d'IL-4, -5 et -13 favorisant le développement d'une réponse des lymphocytes B (production d'anticorps) et des polynucléaires éosinophiles et basophiles. L'orientation vers ce type de réponse est plutôt défavorable pour l'immunothérapie antitumorale car la production d'anticorps contre des antigènes de tumeur ne semble pas jouer un rôle primordial dans la réponse contre la tumeur.

- **La réponse de type Th17**, découverte récemment, oriente les lymphocytes T CD4⁺ vers la production d'IL-17, -21 et -22 et joue un rôle dans la protection contre certaines infections opportunistes (*Candida*, *Staphylococcus*...) et plus généralement contre les bactéries extracellulaires. Un développement excessif de cette réponse est à l'origine de nombreuses maladies autoimmunes (sclérose multiple, psoriasis, maladie de Crohn, etc...). Son rôle dans l'immunité antitumorale semble être multiple et est encore mal caractérisé. Selon le contexte, cette réponse pourrait favoriser la tumeur ou au contraire jouer un rôle protecteur vis-à-vis de la progression tumorale. La détermination exacte de la nature de la réponse Th17 dans le contexte du microenvironnement tumoral sera probablement un facteur à considérer dans le développement de futures immunothérapies ciblées (25,26).

- **La réponse de type T follicular helper** (T_{FH}) a lieu dans les follicules B des organes lymphoïdes secondaires et aide les lymphocytes B à se différencier en plasmocytes (sécrétant les anticorps).

Les T_{FH} expriment le récepteur CXCR5 de manière constitutive ce qui facilite leur recrutement au niveau des follicules B (27,28). L'activation des lymphocytes B est favorisée par la sécrétion d'IL-21 et IL-4 (29).

- **La réponse de type T régulatrice** (Treg) va moduler la réponse immune (principalement Th1) en régulant la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi ou du non soi et en évitant ainsi le développement de maladies autoimmunes. Les Treg produisent des cytokines immunosuppressives dont le TGF- β et l'IL-10 et expriment constitutivement le marqueur membranaire CD25 ainsi que le facteur de transcription *Forkhead box P3* (FoxP3), qui permet la répression de la transcription d'un certain nombre de gènes clés suite à la stimulation du TCR. La fonction des Treg dans la modulation de la réponse antitumorale a été beaucoup étudiée ces dernières années. Leur rôle délétère dans le microenvironnement tumoral, où ils suppriment l'action des LT effecteurs par leur production de cytokines immunosuppressives, en fait une cible d'intérêt pour l'immunothérapie antitumorale (30,31).

Bien que cette polarisation soit clairement établie par les immunologistes, de récents travaux proposent une vision moins stratifiée de la réponse T CD4+, suggérant une certaine plasticité et flexibilité du profil de production de cytokines. Il semblerait, par ailleurs, que l'engagement vers la différenciation soit variable en fonction du phénotype T helper (les lymphocytes Th17 présenteraient une différenciation peu avancée leur conférant une forte plasticité) (figure 4)(23,24).

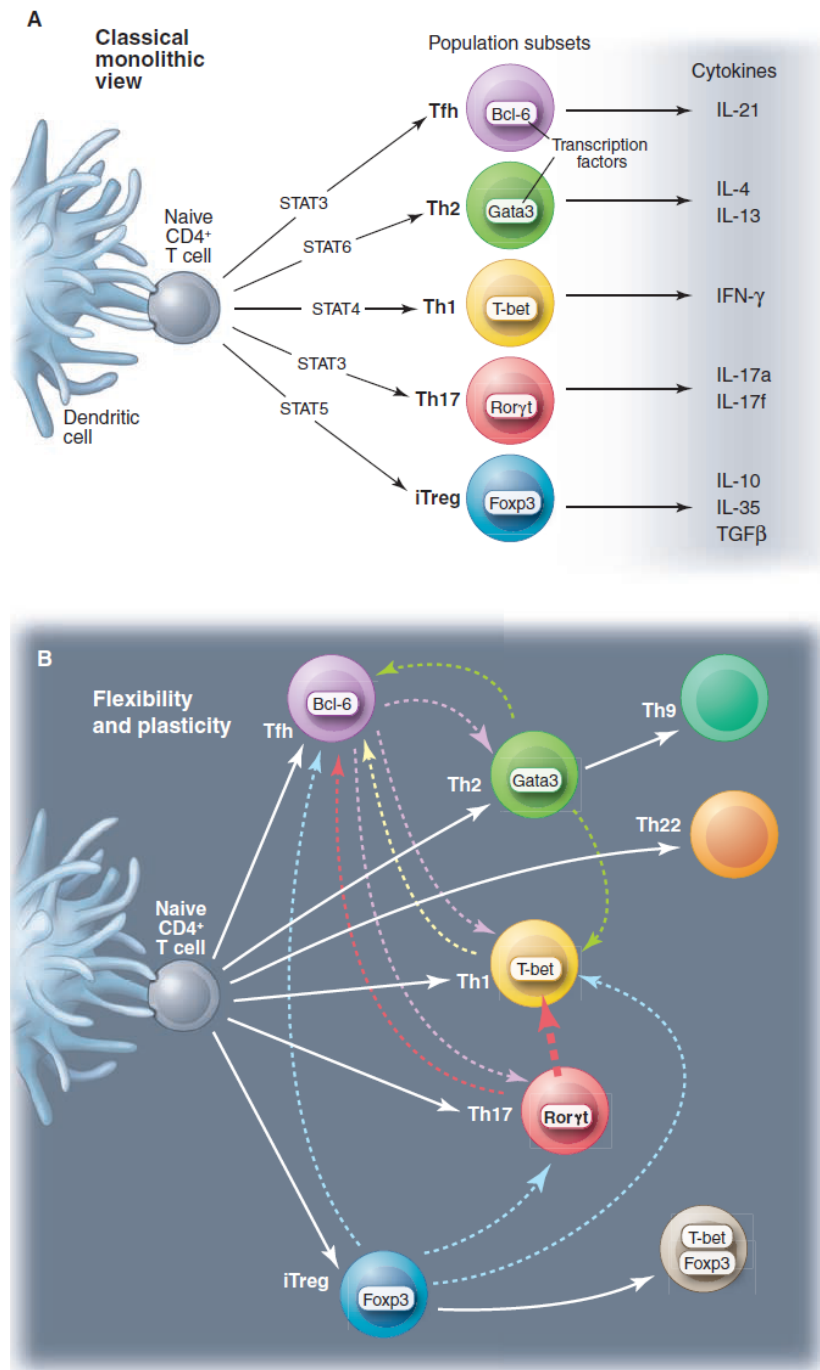


Figure 4 : Différentiation des lymphocytes T CD4⁺ (23). **A.** Vision classique des sous-types de LT helper ou T reg ainsi que leurs principaux facteurs de transcription et profils de sécrétion de cytokines. **B.** Vision plus récente prenant en compte la flexibilité et la plasticité des LT helper ou T reg (variation du profil de production de cytokines et expression transitoire de facteurs de transcription)

➤ **Lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL)**

L'immunité antitumorale adaptative cellulaire est principalement médiée par la réponse cytotoxique obtenue via les lymphocytes T CD8+.

Les LT CD8+ activés vont se différencier en effecteurs T cytotoxiques (CTLs) et ensuite circuler dans les différents organes. Lors d'un contact entre le complexe TCR – CMH I-peptide, plusieurs mécanismes vont provoquer la lyse de la cellule cible. La cytotoxicité engendrée par les CTLs est principalement médiée par l'induction de voies de l'apoptose des cellules cibles (32,33) :

- la voie perforine-granzyme : les CTLs libèrent des perforines qui créent des pores dans la membrane cellulaire. Le granzyme B, une sérine protéase internalisée par la cellule, active la voie des caspases responsable de l'apoptose de la cellule cible.
- la voie des récepteurs de mort (Fas, TNFR1, TRAIL...) : un ligand d'origine lymphocytaire se lie à un récepteur de mort présent à la surface de la cellule cible dont les domaines vont interagir avec la molécule FADD (*Fas Associated Death Domain*), responsable de l'activation de la voie des caspases induisant l'apoptose.

➤ **Régulation des LT activés**

Les lymphocytes T possèdent plusieurs récepteurs de cosignalisation (costimulation ou coinhibition) qui vont réguler la signalisation du TCR et ainsi jouer sur l'activation des LT (34). Le répertoire des récepteurs de cosignalisation des LT est particulièrement varié et dépend de l'environnement tissulaire. Nous nous intéresserons ici aux voies de signalisation les mieux caractérisées, qui ont un intérêt pour l'immunothérapie antitumorale.

Nous avons vu que pour obtenir une activation efficace des LT, l'interaction TCR-CMH-peptide devait être accompagnée de signaux de costimulation, dont l'association CD28-protéines B7 (CD80 ou CD86). Ces signaux permettent aux LT de proliférer, d'acquérir des fonctions effectrices, et éventuellement de migrer vers les tissus. Toutefois, la voie de signalisation du TCR induit aussi l'expression de CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*), un homologue de CD28 spécifique des LT, qui possède une forte affinité pour les protéines B7 des cellules présentatrices d'antigènes. L'interaction de CTLA4 avec les protéines B7 peut ainsi inhiber l'activation des LT en entrant en compétition avec

l'interaction CD28-B7. CTLA4 est décrit comme un modulateur, capable de restreindre l'activité des LT afin de minimiser les lésions des tissus sains en cas de « suractivation » des LT.

Une seconde molécule exprimée tardivement à la surface des LT activés, *PD1* (*programmed cell death 1*), émet un signal inhibiteur lors de l'interaction avec son ligand *PDL1* localisé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (35) (figure 5).

Enfin d'autres voies régulatrices de l'activation des LT, incluant *TIM3* (*T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*) ou encore *VISTA* (*V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation*), ont été identifiées récemment.

Ces voies de cosignalisation ont été exploitées pour le développement d'anticorps monoclonaux antagonistes capables d'inhiber l'interaction CTLA4-B7 ou PD1-PDL1 et ainsi favoriser l'activation et la survie des lymphocytes T spécifiques. L'anticorps ipilimumab (Yervoy®) anti-CTLA4 a notamment obtenu une AMM en 2011 dans le traitement du mélanome métastatique non opérable (36,37).

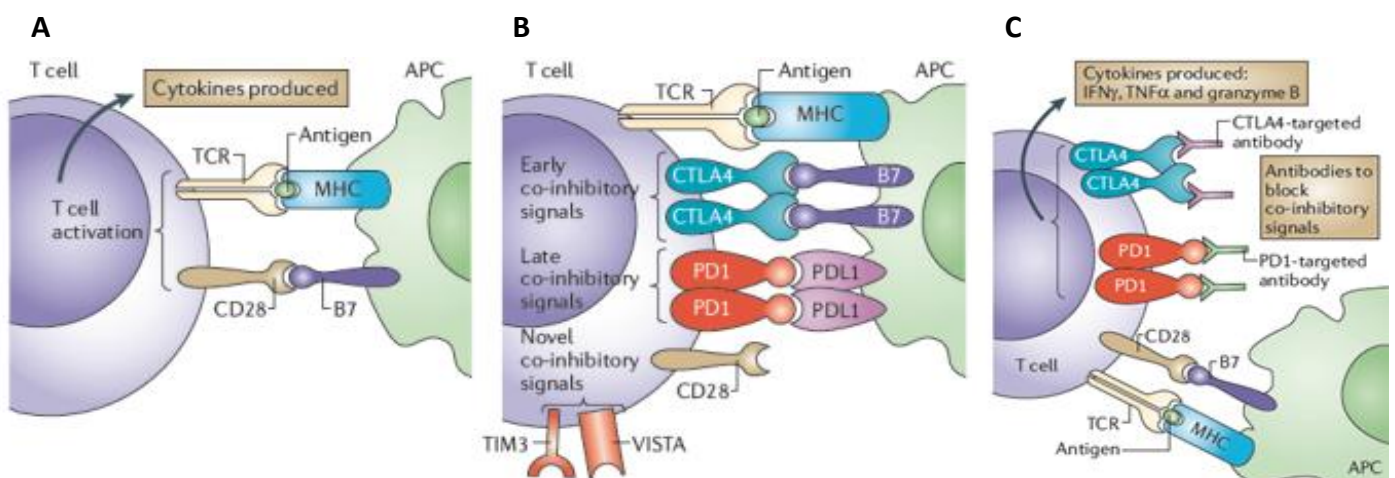


Figure 5 : Mécanismes simplifiés de stimulation et d'inhibition des lymphocytes T et thérapies ciblant ces voies (adapté de Sharma *et al.*)(35). **A.** L'activation des LT débute par l'interaction entre le TCR des LT et l'association CMH-peptide sur les CPAg. Cette interaction est connue sous la dénomination « signal 1 ». Mais l'activation appropriée des LT requiert des signaux supplémentaires dont l'interaction CD28-B7 (signal 2). **B.** Cette activation est limitée par la molécule CTLA4, surexprimée sur les LT activés qui entre en compétition avec CD28. Une régulation est aussi effectuée par PD1, exprimée tardivement sur les LT activés, lors de la liaison avec PDL1. **C.** Stratégies pour maintenir l'activation des LT spécifiques de la tumeur, ciblant CTLA4 et PD1 pour neutraliser les récepteurs de coinhibition.

3. Induire une immunité antitumorale : un challenge multi-étapes ?

Suite à la description des événements permettant d'activer et de réguler l'immunité adaptative cellulaire, au moins trois fondements conditionnant le développement d'une immunité antitumorale efficace se dessinent:

- 1) Promouvoir l'activation des cellules dendritiques pour une présentation efficace de l'antigène tumoral aux cellules T
- 2) Obtenir une (ou des) réponse(s) T protectrice(s) favorable(s) à l'élimination de la tumeur (réponses Th1 et CTL principalement)
- 3) Surmonter l'immunosuppression présente dans le microenvironnement tumoral

Ces éléments peuvent être obtenus en apportant un signal de danger fort, permettant la maturation de la cellule dendritique, conjointement à l'apport exogène ou endogène de l'antigène tumoral. Le choix d'un bon vecteur, capable de délivrer le message antigénique au système immunitaire, fait partie intégrante de la réussite d'une immunothérapie spécifique. L'orientation de la réponse T dépendra du signal de danger perçu par la cellule dendritique (type de PRRs stimulés), qui modulera l'expression des molécules de costimulation à sa surface.

Bien que la réponse recherchée majoritairement dans l'immunothérapie antitumorale soit une réponse TCD8⁺ cytotoxique, il ne faudra pas négliger une réponse T CD4⁺ (principalement Th1) qui potentialise et consolide cette réponse cytotoxique puis permet une réponse mémoire et une protection durable.

Enfin, les lymphocytes T activés et spécifiques de l'antigène devront pénétrer dans le microenvironnement tumoral peu favorable au développement de la réponse T. En effet, en plus d'un pool important de lymphocytes T régulateurs présents dans la tumeur, les cellules tumorales peuvent produire des cytokines immunosuppressives (TGF- β), exprimer des molécules coinhibitrices (PDL1) ou induire la mort par apoptose des cellules T activés (Fas ligand de Fas), et ainsi diminuer nettement l'activité des LT effecteurs (7) (figure 6).

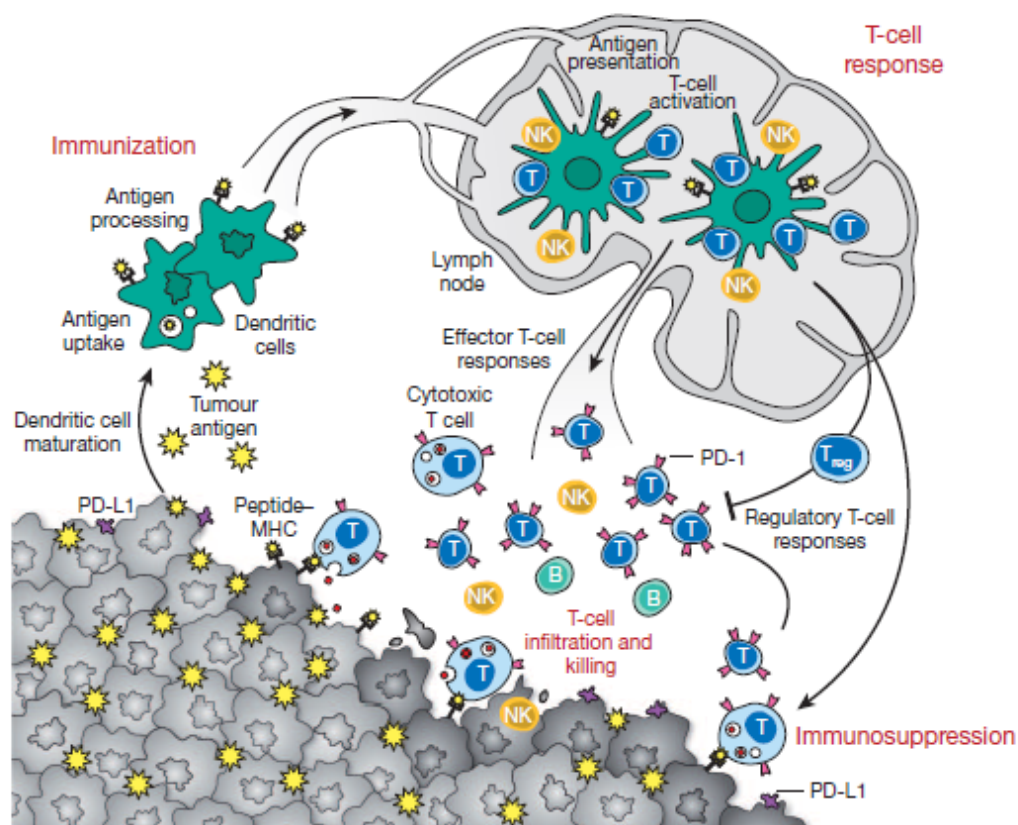


Figure 6: Activation et régulation de l'immunité antitumorale (7). NK : cellules *Natural Killer*, PD1 : *programmed cell death 1*, PDL1 : *programmed cell death ligand 1*

B. Message antigénique

L'immunothérapie active spécifique a pour but de développer une réponse immune contre un ou des antigène(s) tumoral (aux) à l'aide de stratégies vaccinales adaptées. Un des éléments menant au succès de ces traitements est le choix d'un ou de plusieurs antigènes de tumeur comme cible thérapeutique.

En pratique, toutes protéines nouvelles, mutées, surexprimées ou anormalement exprimées par les cellules tumorales peuvent être des antigènes cibles pour l'immunothérapie. Nous décrirons dans un premier temps les différents messages antigéniques qui peuvent être délivrés au système immunitaire, puis nous reviendrons ensuite sur le choix du « bon » antigène.

1. Antigènes multiples, non définis

L'essor des technologies de séquençage haut-débit a permis d'identifier plus de 400 gènes mutés dans un large panel de cancers. En prenant en compte le nombre élevé d'antigènes de tumeurs potentiels, il paraît pertinent d'utiliser un lysat total de tumeur afin de n'exclure aucun antigène d'intérêt. L'injection de lysats tumoraux autologues (ou allogéniques) comme immunothérapie active a été évaluée dans plusieurs essais cliniques et sur différents tissus tumoraux (cancers colorectaux, mélanomes...). Initialement, l'efficacité de cette stratégie a été entravée par l'immunotolérance établie vis-à-vis d'antigènes du soi présents dans la tumeur. Des travaux ont ensuite été menés pour casser cette tolérance, notamment en ajoutant des adjuvants (signaux de danger) pour stimuler le recrutement et l'activation des cellules présentatrices d'antigènes (38). On ne peut par contre s'absoudre d'un risque de réponse autoimmune.

2. Antigènes définis

L'utilisation d'antigènes définis est une approche intéressante dans le but de focaliser la réponse immune à l'encontre d'un antigène de tumeur, limitant ainsi le risque de réponse autoimmune délétère contre des antigènes du soi (contrairement aux antigènes multiples). Depuis la découverte de *MAGE-1*, le premier gène codant un antigène de tumeur humain reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques (39), plusieurs antigènes associés aux tumeurs ou uniques de la tumeur ont été identifiés et ont fait l'objet de multiples essais cliniques. Une classification des antigènes associés aux tumeurs a été établie par Novellino *et al.* en 2004 (toujours d'actualité...) en fonction de leur restriction aux molécules du CMH (épitopes T CD4+ et/ou T CD8+ présenté par le CMH II et le CMH I respectivement) et de leur origine :

- 1) les antigènes associés aux tumeurs, retrouvés aussi sur les tissus sains,
- 2) Les antigènes uniques de tumeurs, totalement absents des tissus sains (40).

➤ **les antigènes associés aux tumeurs, retrouvés de manières prédominantes dans la tumeur ou surexprimés par rapport aux tissus sains**

- Les *cancer/testis (C/T) antigens* ont été largement étudiés et testés en clinique, dans des vaccins antitumoraux, ces 20 dernières années. En tête de liste nous pouvons citer les antigènes *MAGE*, *BAGE* et *GAGE* ainsi que le très connu *NY-ESO-1*. Les *C/T antigens* sont exprimés dans les spermatocytes et rarement au niveau placentaire. L'expression tumorale résulte de la réactivation de gènes normalement « éteints » dans les tissus adultes. Le risque de réaction autoimmune à l'encontre des gamétocytes, dans le cadre d'immunothérapie avec ces antigènes, est faible, voire nul, car il s'agit d'un site immunoprivilégié (tolérance plus élevée du système immunitaire).

- Les antigènes de différenciation tissulaire sont retrouvés principalement dans les mélanomes, les cancers de la prostate et du colon. Ces protéines sont exprimées à la fois par le tissu sain et les cellules tumorales d'où est originaire la tumeur, alors qu'elles sont absentes des autres tissus de l'organisme. C'est le cas des antigènes de différenciation des mélanocytes (*MART1/melan-A*, *gp100* ou *Tyrosinase*), de la prostate (*prostate specific antigen*, *PSA*) ou du colon (*Carcinoma Embryonnary Antigen*, *CEA*). Malgré le risque de réaction contre les tissus sains, ces antigènes ont été et sont toujours exploités pour le développement de nouveaux vaccins antitumoraux.

- Les antigènes surexprimés par la tumeur sont les antigènes les plus largement répandus. On les retrouve globalement dans de nombreux types de cancers, sans expression préférentielle liée à un certain tissu tumoral, ainsi que dans les tissus normaux, à des niveaux d'expression plus faibles. Il est souvent évoqué dans la littérature que l'expression ou la présentation de ces antigènes par le CMH du tissu normal est inférieure au seuil de reconnaissance par les cellules T. Inversement, dans les tissus tumoraux, un niveau d'expression et de présentation élevée de l'antigène favorise une réponse T. Parmi les antigènes surexprimés dans les tumeurs, les protéines anti-apoptotiques (*survivin*, *livin*), ou encore le facteur de croissance *HER-2/neu* ont fait l'objet de nombreuses études.

➤ les antigènes exprimés uniquement par la tumeur (41)

- Les protéines du soi résultant de mutations génétiques (p53 mutée ou Ras mutée). L'intérêt de cibler ce type d'antigènes est qu'ils jouent un rôle majeur dans le développement tumoral car il s'agit d'oncogènes ; le risque d'échappement de la tumeur et d'immunosélection est donc absent si cette protéine est cruciale dans le maintien du statut tumoral.
- Les protéines virales issues de virus oncogènes type *Epstein Barr virus* ou *Human papilloma virus 16* et *18*, responsables de tumeurs viro-induites
- Les protéines de fusion, produits de translocation chromosomique comme par exemple la translocation t(9 ;22) retrouvée dans la leucémie myéloïde chronique
- Les protéines dont les modifications post-traductionnelles sont altérées ; c'est le cas de la protéine MUC1 dont l'absence de glycosylation démasque un nouvel épitope. Ces antigènes sont regroupés actuellement dans une nouvelle classe d'antigènes : les « *tumor-associated carbohydrate antigens* » (TACAs). Ces antigènes sont peu immunogènes en raison de leur similarité avec la protéine normale. Plusieurs essais sont actuellement effectués en clinique en association à des adjuvants pour accroître leur immunogénicité.

3. La quête du « bon message antigénique» (42)

Une étude réalisée par le *National Cancer Institute* a proposé une hiérarchisation de 75 antigènes de tumeurs, en fonction d'un score calculé sur 9 critères d'importance décroissante, permettant de définir l'antigène de tumeur idéal pour l'immunothérapie active (tableau 1). L'objectif de cette étude était de promouvoir la recherche translationnelle (chaînon manquant entre la recherche fondamentale et la recherche clinique) en aidant les investigateurs dans leur choix d'une cible adaptée.

Des sous-critères avaient ensuite été établis afin d'attribuer un score pour chaque critère.

Criteria	Top subcriteria
Therapeutic function	Superb data controlled vaccine trial suggestive
Immunogenicity	T-cell and/or antibody responses elicited in clinical trials
Oncogenicity	Associated with oncogenic process (i.e., oncogenic "self" protein)
Specificity	Absolutely specific (e.g., mutated oncogene, idiotype protein, or viral protein)
Expression level and % positive cells	Highly expressed on all cancer cells in patients designated for treatment
Stem cell expression	Evidence for expression on putative cancer stem cells
No. patients with antigen-positive cancers	High level of expression in many patients with a particular tumor type
No. epitopes	Longer antigen with multiple epitopes and the potential to bind to most MHC molecules
Cellular location of expression	Normally expressed on the cell surface with no or little circulating antigen

Tableau 1 : Caractéristiques de l'antigène de tumeur idéal (42)

Une réponse favorable déjà obtenue en clinique en utilisant l'antigène, l'immunogénicité (réponse cellulaire ou humorale spontanée ou obtenue lors d'essais cliniques), l'oncogénicité (persistance de l'expression, rôle dans le processus tumoral) et la spécificité étaient les 4 critères majeurs définis par les experts pour l'évaluation des antigènes tumoraux (tableau 2).

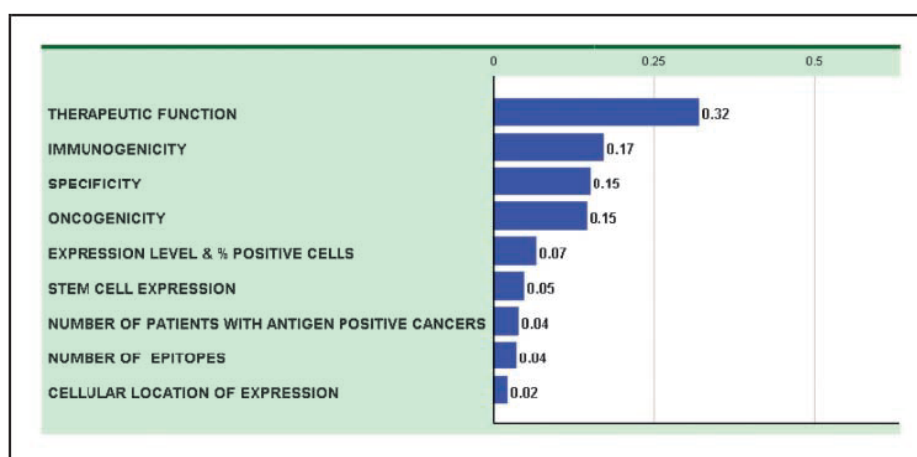


Tableau 2 : Importance relative des critères majeurs définissant un antigène de tumeur idéal (42)

Les résultats de cette étude ont été tout d'abord analysés en prenant en compte les 9 critères, et les 75 antigènes ont été classés en fonction de leur score global (figure 7). Les scores les plus élevés sont attribués majoritairement aux antigènes de tumeurs découverts dans les années 90, qui ont été testés en clinique à plusieurs reprises, avec des modalités vaccinales adaptées pour améliorer leur immunogénicité.

Dans une seconde analyse, plus adaptée à l'évaluation intrinsèque des antigènes, les auteurs ont effectué une classification en supprimant les facteurs d'efficacité thérapeutique et d'immunogénicité. En effet, ces deux critères sont potentiellement modulables, par la

réalisation de nouveaux essais cliniques pour le premier, ou par une formulation ou des modalités vaccinales plus adaptées pour le second. Par contre, les autres critères sont des critères biologiques qui ne peuvent être modifiés et qui définissent véritablement la « valeur » de l'antigène. La spécificité et l'oncogénicité ainsi que le niveau d'expression et le pourcentage de cellules exprimant l'antigène deviennent les critères majeurs de l'évaluation (figure 8). On observe que les antigènes classés parmi les plus pertinents lors de la première analyse sont rétrogradés à des scores plus faibles, laissant place aux antigènes uniques de tumeurs (protéines mutées, protéines virales...).

En résumé, aucun des antigènes identifiés ne répond parfaitement à la définition de l'antigène de tumeur idéal. La plupart d'entre eux ne sont que d'une spécificité très relative (seulement 9 sur 75 obtiennent le score maximal pour le critère *spécificité*).

Il est intéressant de constater que la phosphatase acide prostatique (PAP), le seul antigène utilisé dans le cadre d'une immunothérapie active ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (sipuleucel-T, PROVENGE®, 2011), se classe en 26^{ème} et en 69^{ème} position en présence ou en l'absence respectivement de prise en compte des critères d'efficacité thérapeutique et d'immunogénicité. Cette observation souligne un point important : le succès d'une immunothérapie active n'est pas nécessairement conditionné par la spécificité ou l'oncogénicité de l'antigène tumoral ; l'amélioration de son immunogénicité (par des adjuvants par exemple...) peut en faire un bon antigène de tumeur.

Si on tient compte de cette analyse d'experts, un facteur conditionnant la réussite d'une immunothérapie antitumorale est le choix d'une cible antigénique exprimée exclusivement par la tumeur (spécificité) et nécessaire à sa survie (oncogénicité). Une expression forte et universelle de l'antigène (tous types de patients et éventuellement tous types de tumeurs) fait partie des critères de choix.

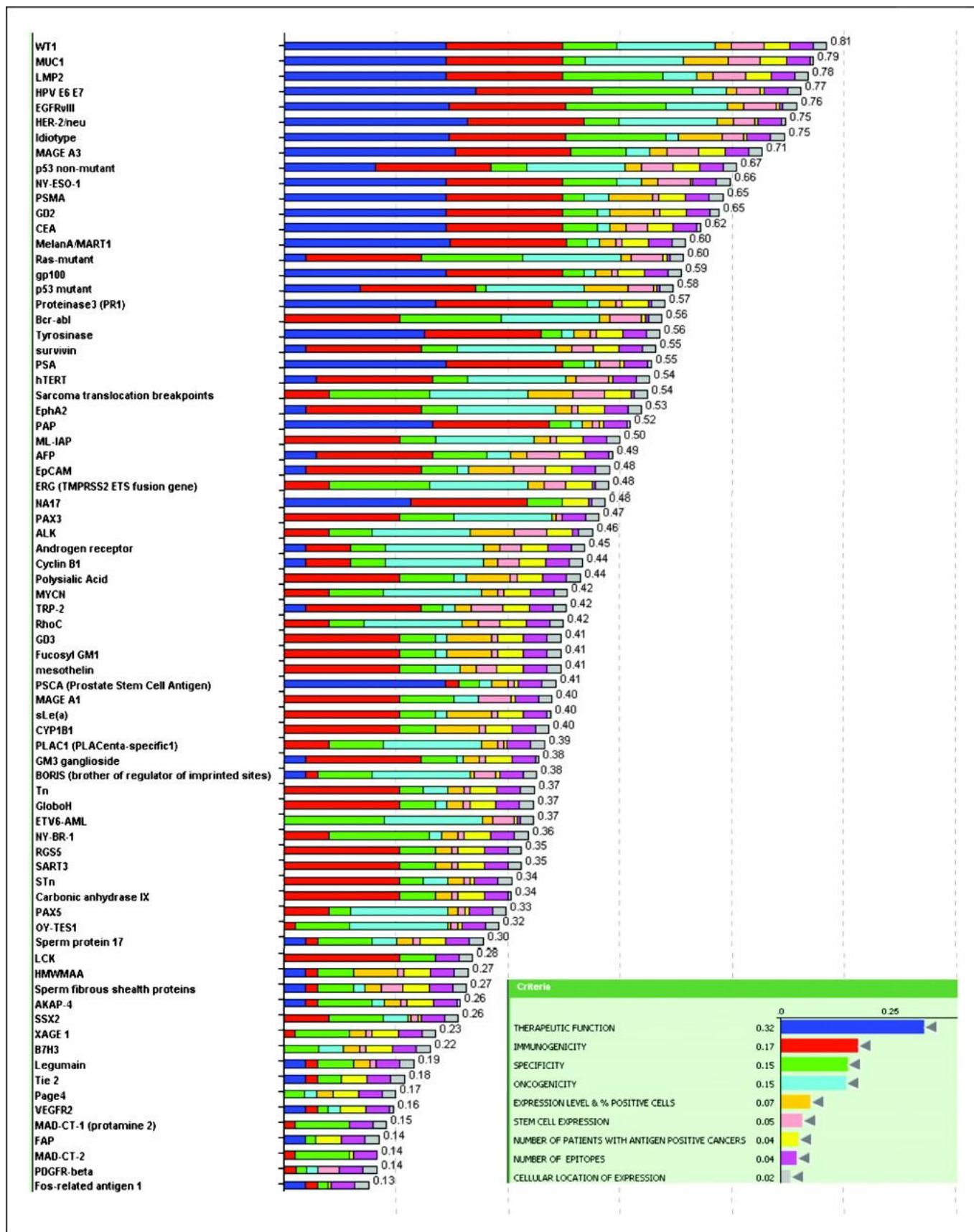


Figure 7 : Hiérarchisation des antigènes de tumeurs effectuée à partir des critères prédéfinis par les experts.

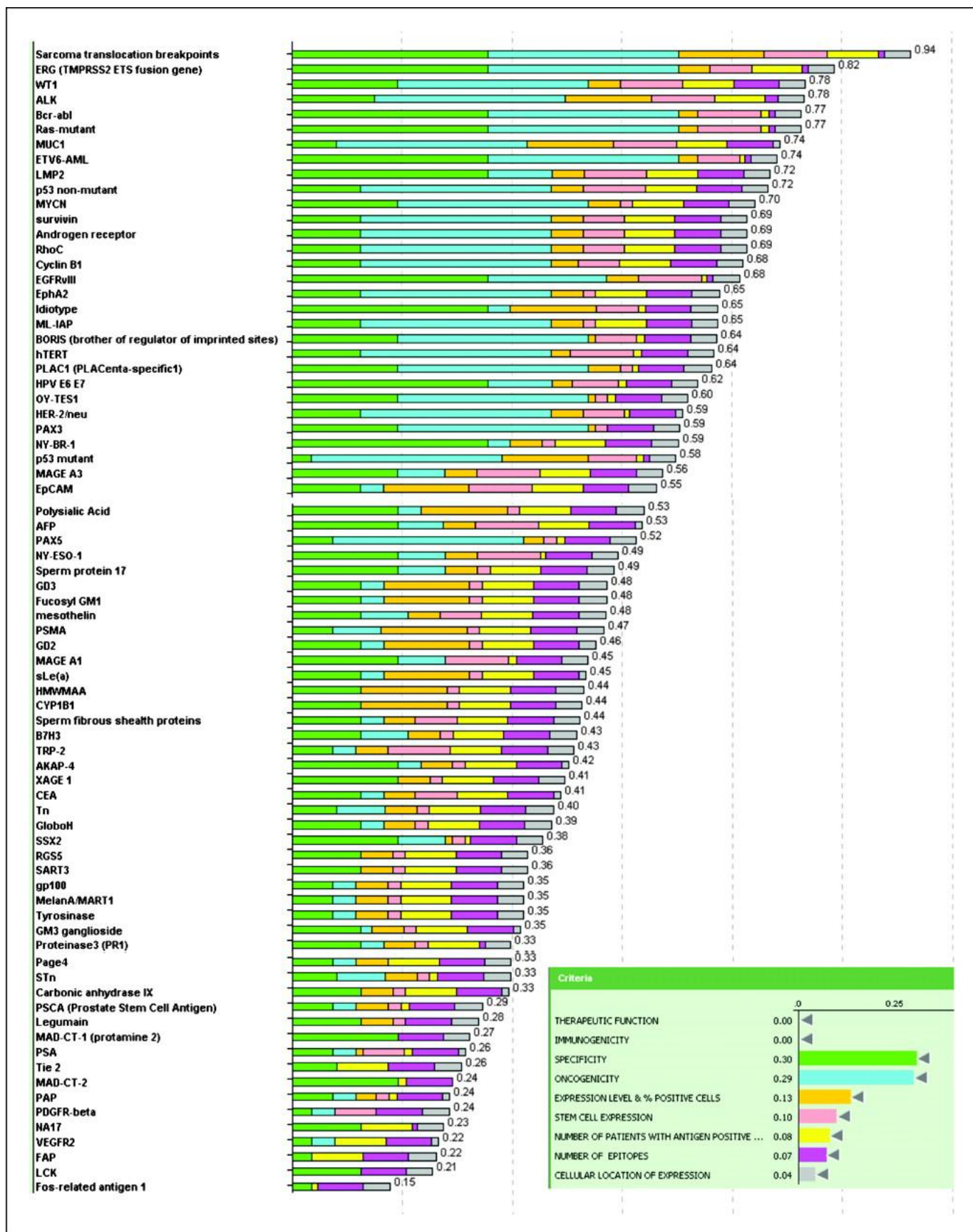


Figure 8 : Classification des antigènes de tumeurs après exclusion des critères d'efficacité thérapeutique et d'immunogénicité.

C. Stratégies d'immunothérapie des cancers

Actuellement, 234 essais cliniques sur tumeurs solides et 35 autres dans le cadre de leucémies ou de myélomes sont référencés dans la base de données « *Cancer vaccines* » du *National Cancer Institute* (NCI) (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials>). Il nous sera difficile dans cette partie de détailler les différentes stratégies d'immunothérapies antitumorales de manière exhaustive, cependant nous décrirons les principales mises en œuvre dans les essais cliniques de phase II et III.

L'antigène peut être soit injecté directement sans système de vectorisation, soit chargé dans les cellules dendritiques de manière exogène puis réinjecté, soit être vectorisé *in vivo*.

1. Antigènes tumoraux non vectorisés

Suite à l'identification des antigènes de tumeurs, une mise au point de « vaccins antitumoraux » comparables aux vaccins protéiques anti-infectieux (antigène HBs de l'hépatite B) ont été développés. Cette stratégie consiste à injecter directement des peptides ou des protéines antigéniques (simple ou combinés) conjointement à un ou des adjuvants capables d'activer les cellules présentatrices d'antigènes (GM-CSF, IL-12, IFN- α , CpG...). Des réponses partielles ou complètes ont été obtenues chez quelques patients avec une réaction lymphocytaire T spécifique, mais l'efficacité de ce type de vaccin reste très inconstante. Par ailleurs se pose le problème de la délivrance de l'antigène, dont la présentation par le CMH I n'est pas favorisée par ce type d'administration, hormis dans le cas de la cross-présentation.

Plusieurs essais de phase II et III sont actuellement effectués avec des peptides ou des protéines recombinantes couplés à des cytokines (GM-CSF) ou à des ligands des TLRs (tableau 3).

L'immunogénicité des protéines ou peptides antigéniques peut être améliorée par l'utilisation des *Heat Shock Proteins* (HSPs), protéines chaperones présentes dans pratiquement toutes les cellules eucaryotes. En conditions physiologiques, elles aident au repliement des protéines et au transport intracellulaire des peptides. Dans le cas d'un stress, choc thermique, inflammation, tumeurs etc... l'expression des HSPs peut être dérégulée. Il a

été démontré que l'utilisation des HSPs purifiées d'une tumeur pouvait entraîner une réponse contre cette tumeur lorsqu'elles étaient réinjectées. Couplées à des antigènes (peptides) de tumeurs elles permettent de générer une réponse T CD8+ spécifique des peptides tumoraux. Par ailleurs elles activeraient l'immunité innée par leur fixation aux TLRs, leur conférant des propriétés uniques pour l'immunothérapie antitumorale (43,44).

Des peptides de tumeurs couplés à HSPgp96 sont en essais cliniques de phase II dans le traitement du glioblastome (tableau 3).

2. Cellules dendritiques chargées en antigènes *ex vivo* puis réinjectées

La cellule dendritique étant au centre de la réponse immune spécifique, les immunothérapeutes ont rapidement pensé à les utiliser pour obtenir une réponse antitumorale. Plusieurs moyens ont été développés pour produire les CD à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) obtenues par leucophérèse (séparation des globules blancs du sang). La méthode employée couramment consiste à différencier les PBMC en CD par l'utilisation de cytokines (GM-CSF, IL-4) puis à charger ces cellules en antigènes de tumeur soit par :

- Transfection ou transduction (vecteur viral) de l'ADN ou l'ARNm codant celui-ci
- Incubation dans une solution d'antigènes (phagocytés par la CD).

L'activation des CD est effectuée de différentes manières (selon la recette du laboratoire) mais on retrouve généralement l'utilisation de LPS, GM-CSF, ligand CD40... Une fois les cellules dendritiques « éduquées », elles sont réinjectées au patient de manière répétée pour présenter les peptides épitopes via les molécules du CMH aux LT du receveur (figure 9). Sipuleucel-T (Provenge[®]), la première immunothérapie antitumorale active et spécifique ayant obtenu une AMM par la FDA, utilise des cellules dendritiques autologues chargées *ex vivo* par la protéine dimérique recombinante phosphatase acide prostatique (PAP)-GM-CSF (4).

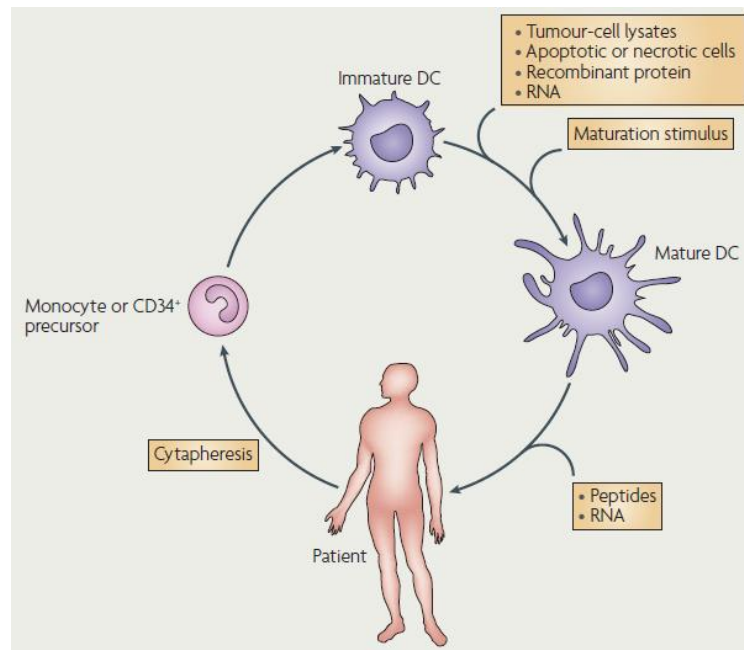


Figure 9 : Approche vaccinale basée sur l'éducation *ex vivo* des cellules dendritiques puis la réinjection afin d'induire l'immunité antitumorale. (45)

De nombreux essais cliniques de phase II et III reprenant cette stratégie sont en cours sur différentes tumeurs solides (tableau 3) ; ces essais ont donné de bons résultats dans plusieurs études, notamment pour DCVax®-Brain qui est en phase III. La voie ouverte par l'AMM du sipuleucel-T va certainement faciliter l'accès au marché de ce nouveau type de thérapies.

3. Utilisation de vecteurs

L'évolution des connaissances en microbiologie et en virologie a permis l'utilisation des mécanismes infectieux d'agents pathogènes pour le développement de l'immunothérapie. Des vecteurs atténués, injectés *in vivo*, capables de délivrer les antigènes tumoraux dans le compartiment cellulaire adapté, et de stimuler l'immunité innée par le signal de danger qu'ils apportent, ont été élaborés.

➤ **Vecteurs plasmidiques (ADN nu)(46)**

Il s'agit de plasmides bactériens modifiés contenant l'ADNc d'un antigène de tumeur à cibler. La transcription du gène d'intérêt est sous le contrôle de promoteurs actifs dans les cellules mammifères (47).

L'administration de l'ADN nu est généralement associée à des adjuvants divers pour augmenter l'immunogénicité du vaccin. Un ADN codant une cytokine est parfois même intégré directement au vecteur plasmidique (GM-CSF, IL-12). Le mode d'administration est variable selon les technologies développées, mais l'administration intramusculaire suivie d'une électroporation au site d'injection semble donner des résultats intéressants dans deux études de phase II (tableau 3).

➤ **Liposomes**

Les liposomes sont des vésicules composées d'une partie interne aqueuse et d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques externes. L'encapsulation en liposomes de peptides antigéniques est une stratégie permettant la délivrance directement dans le compartiment intracellulaire des cellules présentatrices d'antigènes (présentation aux lymphocytes T par le CMH I). Les résultats d'une étude clinique de phase III (Stimuvax®, BLP25) ont été publiés fin 2012 et ne montrent malheureusement pas d'amélioration de la survie globale des patients traités (tableau 3) (48).

➤ **Vecteurs viraux (49)**

Les virus recombinants non réplicatifs peuvent infecter les cellules de l'organisme et utiliser la machinerie cellulaire pour produire des antigènes de tumeur. Ces vecteurs sont particulièrement intéressants car ils vont favoriser la présentation des antigènes produits par le CMH I, mimant la présentation des antigènes lors d'une infection virale naturelle. L'activation des TLRs intracellulaires va en plus faciliter la maturation de la cellule présentatrice d'antigène infectée. Cependant l'utilisation des virus, bien que non réplicatifs, pose toujours le problème de l'intégration non spécifique dans le génome des cellules, mettant en jeu la sécurité du vecteur.

Plusieurs types de virus sont étudiés en phase clinique, les plus couramment retrouvés étant les *poxvirus*.

PROSTVAC® -VF TRICOM™, un virus de la vaccine recombinant contenant l'ADNc de la PSA (*Prostate-Specific Antigen*) et de 3 molécules de costimulation (B7-1, LFA-3 et ICAM-1), est en étude clinique de phase III en association avec GM-CSF dans le cancer de la prostate (50). L'entreprise française Transgène fait figure de leader dans ce domaine avec un virus recombinant de la vaccine contenant une séquence codant l'antigène MUC1 en association avec l'IL-2 en traitement du cancer des poumons non à petites cellules (tableau 3).

➤ Vecteurs bactériens

De par leurs caractéristiques intrinsèques, les bactéries peuvent être d'excellents vecteurs pour l'immunothérapie antitumorale (51). Elles ont été utilisées, et elles le sont encore dans le cadre de la BCG-thérapie, pour stimuler le système immunitaire de manière non spécifique. Il est maintenant acquis que de par leur forte capacité à stimuler les TLRs, les bactéries ou certains éléments bactériens (LPS) peuvent être d'excellents adjuvants naturels. La découverte des facteurs de virulence permettant l'injection intracytoplasmique de toxines (système de sécrétion de type III de bactéries Gram négatif) ou la libération du contenu phagosomal (listeriolysine de *Listeria monocytogenes*) a ouvert la voie à de nouvelles stratégies de délivrance intracellulaire d'antigènes.

Ce type de vecteurs ainsi que leur développement clinique ont fait l'objet d'une courte revue publiée récemment par notre laboratoire (en annexe) (52). Nous ne décrivons ici que brièvement les différentes stratégies existantes :

- ***Listeria monocytogenes* et listeriolysine**

L. monocytogenes est une bactérie intracellulaire capable d'éviter la bactéricidie mise en place par les macrophages et les polynucléaires. Cet échappement est dû à la sécrétion par la bactérie de la listeriolysine, une toxine qui provoque la rupture de la membrane lysosomale. Les bactéries sont alors libérées dans le cytoplasme et les peptides issus de la dégradation de la bactérie vont être présentés aux lymphocytes T par la voie du CMH I. Ainsi







un vecteur bactérien exprimant la listeriolysine couplée à un antigène de tumeur permet d'activer *in vitro* et *in vivo* la production de lymphocytes T CD8+ spécifiques de cet antigène (53). L'utilisation en immunothérapie antitumorale a montré son intérêt chez la souris à de multiples reprises (54). Deux essais cliniques de phase II évaluent actuellement l'efficacité du vecteur bactérien *Listeria monocytogenes* atténué dans le traitement du cancer du col de l'utérus et du pancréas (en association avec GVAX, cellules tumorales irradiées et transfectées par GM-CSF) (tableau 3).










- **Bactéries Gram négatif et système de sécrétion de type III (SSTT)**










Le SSTT est principalement caractérisé chez les genres *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* et *Pseudomonas*. Il s'agit d'un facteur de virulence majeur de ces bactéries, souvent comparé à une seringue, qui permet d'injecter des toxines spécifiques directement dans le cytoplasme de cellules cibles. L'intérêt d'exploiter cette voie de délivrance pour l'immunothérapie est la présentation par la voie du CMH I des protéines injectées (55). Il faut ajouter que les cellules cibles du SSTT sont majoritairement les cellules phagocytaires, recrutées par chimiotactisme au site inflammatoire (56). Nous décrirons plus précisément dans la partie suivante la vectorisation d'antigènes par le SSTT.

Malgré le foisonnement d'études précliniques ayant testé et montré l'efficacité du vecteur *Salmonella* dans des applications variées, peu d'études cliniques ont été réalisées jusqu'à présent (57).

Tableau 3 : Immunothérapies antitumorales ayant obtenu une AMM ou en études cliniques de phase II ou III (recueil effectué à partir de la base de données d'essais cliniques du *National Cancer Institute*).

Formulation	Antigène(s) ciblé(s)	Adjuvant(s)	Description	Indication(s)	Développement clinique	Investigateur(s)
Cellules dendritiques obtenues à partir de PBMC autologues (leucophrèse)	Phosphatase acide prostatique (PAP), expression par 95% des tumeurs prostatiques	Protéine de fusion recombinante PAP-GM-CSF	Administration répétée de CD activées et chargées par la protéine recombinante	Cancer de la prostate métastatique résistant à l'hormonothérapie	sipuleucel-T (Provenge®) approuvé FDA	 http://www.dendreon.com
Peptides	Peptides provenant de la tumeur du patient	Heat shock protein gp96 (HSPgp96)	Administration répétée de protéine HSP gp96 associée aux peptides de tumeur	Glioblastome, tumeurs solides	vitespen (Oncophage®), approuvé en Russie dans le cancer du rein non métastatique, phase II aux U.S.	 http://www.agenusbio.com
Cellules dendritiques obtenues à partir de PBMC autologues (leucophrèse)	Pool d'antigènes de tumeur du patient	?	Administrations intradermique répétées de CD activées, puis chargées par l'antigène ou un lysat tumoral	Glioblastome multiforme	DCVax®-Brain (ou DCVax®-L) phase III	 http://www.nwbio.com
	Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA)	?		Cancer de la prostate	DCVax®-Prostate phase III	
	Pool d'antigènes de tumeur du patient	ARN CD40 ligand	Administrations répétées de CD activées, puis chargées (par électroporation) par des ARN codant pour les antigènes de tumeur du patient	Cancer du rein métastatique	AGS-003+traitement standard phase III Monothérapie AGS-003 phase II	 http://www.argostherapeutics.com
	Protéine de fusion Mannane-MUC1 (MFP)	Mannane (dérivé du mannose)	Administrations répétées de CD activées et chargées par la protéine recombinante	Cancer des ovaires	Cvac™ phase III	 http://www.primabiomed.com.au
Cellules tumorales allogéniques irradiées et génétiquement modifiées	alpha (1,3) galactosyl transférase (α-GT) (structure carbohydrate)	Structure carbohydrate	Administrations répétées	Cancer des poumons non à petites cellules au stade avancé (NSCLC)	HyperAcute® Lung phase II/III	 http://www.newlinkgenetics.com
		Structure carbohydrate+PEG-intron		Traitement adjuvant post-chirurgical du cancer du pancréas	HyperAcute® Pancreas phase III (statut de médicament orphelin)	
				Mélanome	HyperAcute® Melanoma phase II	
Cellules tumorales allogéniques irradiées non modifiées	Pool d'antigènes de tumeur du patient	BCG, GM-CSF	Administrations répétées d'une association entre cellules tumorales allogéniques et BCG+GM-CSF	Traitement adjuvant post-chirurgical du mélanome de stade II ou III	CSF-470 phase II/III	Laboratorio Pablo Cassará S.R.L.

Formulation	Antigène(s) cible(s)	Adjuvant(s)	Description	Indication(s)	Développement clinique	Investigateur(s)
Virus recombinant (poxvirus)	MUC 1	Virus de la vaccine recombinant et IL-2	Administration sous-cutanée répétée de virus recombinant exprimant l'IL-2 et MUC1	NSCLC métastatique, associée à une chimiothérapie	TG4010 (MVA-MUC1-IL2) phase IIb/III	 http://www.transgene.fr
Virus recombinant (poxvirus)	PSA	Molécules de costimulation (TRICOM®) + virus + GM-CSF	?	Cancer de la prostate métastatique résistant à l'hormonothérapie	PROSTVAC® phase III	 http://www.bavarian-nordic.com
	CEA, MUC-1		?	Cancer des ovaires et du sein métastatiques	CV-301 phase II	
Lipopeptide	MUC-1	Monophosphoryl Lipid A	Administration IV répétée	NSCLC (stade 3)	L-BLP-25 (StimuVax®) phase III (échec fin 2012)	 http://www.oncothyreon.com
Peptides	hTert (sous-unité de la telomerase)	GM-CSF	Injection intradermique répétée associant GM-CSF et un peptide de la telomerase	NSCLC non opérable (stade 3), cancer du pancréas avancé ou métastatique	GV1001 phase III	 http://www.kaelgemvax.com
	peptide E75 dérivé de HER2	GM-CSF	Administration répétée intradermique de peptide E75 associé au GM-CSF	Cancer du sein	nelipepimut (NeuVax™) phase III	 http://www.galenabiopharma.com
Protéines	Pool d'antigènes solubles de surface partiellement purifiés, à partir de 3 tumeurs allogéniques	alum	Administration intradermique répétée	Mélanome post-chirurgical à haut risque de rechute	POL-103A phase III	 http://www.polynoma.com
Protéines recombinantes	Antigènes polyvalents conjugués à KLH (GM2-KLH, Globo-H-KLH, Tn-MUC1-32mer-KLH, TF-KLH, et sTn-KLH)	OPT-821	Administration sous-cutanée répétée d'adjuvants couplés aux antigènes polyvalents couplés à KLH	Cancers gynécologiques	phase III	 http://www.gog.org
	Herpes Zoster Subunit (HZ/su)	?	Administration intramusculaire répétée de HZ/su	Leucémies	GSK1437173A phase III	 http://www.gsk.com
	EGFRvIII (EGFR muté)	GM-CSF	Administration répétée de protéine EGFRvIII/GM-CSF	Glioblastome	Rindopepimut phase III	 http://www.cellidextherapeutics.com

Formulation	Antigène(s) ciblé(s)	Adjuvant(s)	Description	Indication(s)	Développement clinique	Investigateur(s)
Cellules dendritiques obtenues à partir de PBMC autologues (leucophrèse)	Pool d'antigènes de tumeur du patient	LPS bactérien, IFN-γ	Administration répétée de CD activées et chargées par un lysat tumoral	Traitement adjuvant : glioblastome multiforme (GBM-Vax), cancers pédiatriques et urologiques, sarcomes	GBM-Vax II phase (statut de médicament orphelin)	 ACTIVARTIS Activartis Biotech GmbH http://www.activartis.com
	<i>Her2/neu</i>	Protéine de fusion recombinante <i>Her2/neu</i> -GM-CSF	Administration répétée de CD activées et chargées par la protéine recombinante	Traitement adjuvant : carcinome urothelial HER2+	lapuleucel-T (Neuvenge™), phase II	 Dendreon Targeting Cancer, Transforming Lives™ http://www.dendreon.com/
Bactérie atténuée <i>Listeria monocytogenes</i>	HPV E7	Bactérie <i>Listeria monocytogenes</i>	Administration répétée de <i>Listeria</i> atténuée exprimant la mésothelin (ADX511-001)	Cancer du col avancé et/ou récurrent HPV-induit	ADX511-001 II phase	 NATIONAL CANCER INSTITUTE ADVAXIS http://www.advaxis.com
Bactérie atténuée <i>Listeria monocytogenes</i> couplée à GVAX	mesothelin	Bactérie <i>Listeria monocytogenes</i> et GVAX	Administration séquentielle de <i>Listeria</i> atténuée exprimant la mésothelin (CRS-207) et de cellules tumorales pancréatiques irradiées sécrétant du GM-CSF (GVAX)	Cancer du pancréas	CRS-207+GVAX (statut de médicament orphelin pour GVAX) phase II	 ADURO BIOTECH http://www.adurobiotech.com
Protéines recombinantes	recMAGE-A3	Adjuvant System (AS15)	Administration répétée de protéine recMAGE-A3 associé à l'adjuvant AS15	Mélanome métastatique inopérable, traitement adjuvant du cancer vésical	phase II	 gsk GlaxoSmithKline http://www.gsk.com
Peptides	survivin	Montanide ISA-51 VG	Administration répétée d'un peptide contenant différents épitopes de la survivin et associé au montanide ISA-51 VG	Mélanome, carcinomes du col, du pancréas et du colon à stade avancé	phase II	 UNIVERSITÄT WÜRZBURG
	peptides P16_37-63 issu de p16INK4a	Montanide ISA-51 VG	Administration répétée du peptide P16_37-63 en combinaison au montanide ISA-51 VG	Cancers à stade avancé HPV-induit et exprimant p16INK4a	phase II	 KRANKENHAUS NORDWEST http://www.krankenhaus-nordwest.de
ADN	NY-ESO-1	Monophosphoryl Lipid A (MPLA) de <i>B. pertussis</i>	Administration intramusculaire répétée d'une association NY-ESO-1 et MPLA	Mélanome, cancers des ovaires et du poumon	phase I/II	 INCTR International Network for Cancer Treatment and Research http://www.inctr.org
	HPV16 E6/E7, HPV18 E6/E7	Néant	Administration intramusculaire répétée d'ADN (VGX-3100) par électroporation	Cancer du col HPV-induit	VGX-3100 phase II	 inovio PHARMACEUTICALS http://www.inovio.com
	Wilms' tumor gene 1 (WT1),	Néant	Administration intramusculaire répétée d'ADN (WT1) par électroporation	LMA, LMC	ADN WT1 phase II	

D. Immunothérapie antitumorale et *Pseudomonas aeruginosa*

1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un bacille Gram négatif non fermentaire de l'environnement. Il s'agit d'une bactérie dont le pouvoir pathogène s'exprime dans des situations bien particulières : la mucoviscidose, l'immunodépression, les infections nosocomiales (chirurgie, réanimation, grand brûlés...), etc... *P. aeruginosa* devient un pathogène puissant lors d'une infection notamment parce qu'il est doté de nombreux facteurs de virulence : lipopolysaccharides (LPS), exotoxine A, protéases (élastases, collagénase) et phospholipases ainsi que diverses toxines sécrétées par plusieurs systèmes de sécrétion dont le système de sécrétion le type III (SSTT). Chez les patients immunocompétents, la bactérie est incapable de développer une infection notamment grâce aux barrières physiques (peau, muqueuses,...) mais aussi à l'immunité innée et adaptative.

Plusieurs études ont décrit le SSTT comme élément primordial de la virulence aiguë de la bactérie.

➤ Système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*

Les bactéries Gram négatif possèdent 6 systèmes de sécrétion différents qui participent au transport de différentes protéines au travers de la membrane bactérienne. Nous nous limiterons ici à la description du SSTT dont la particularité est d'injecter des protéines, plus précisément des exotoxines, directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (58,59). Le SSTT est constitué de plus de 20 protéines (60), dont la synthèse est sous la dépendance du facteur transcriptionnel ExsA (61), formant deux sous-unités : l'appareil de sécrétion et l'appareil de translocation (figure 10).

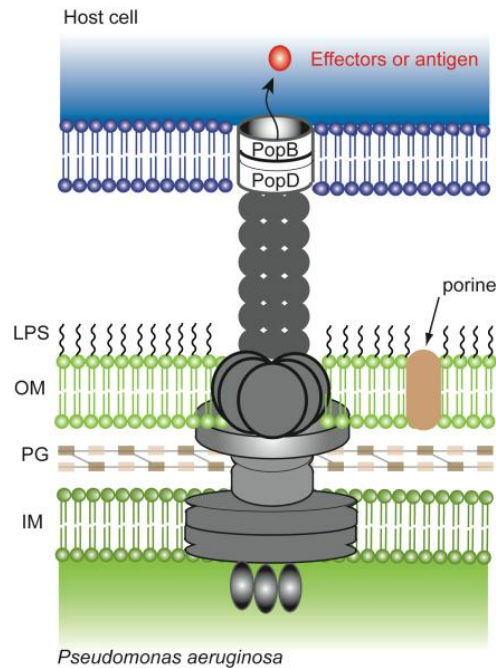


Figure 10 : Système de sécrétion de type III de *Pseudomonas aeruginosa*. Le SSTT s'apparente à une « seringue » traversant les deux membranes bactériennes et capable de s'enchasser dans la membrane de la cellule eucaryote cible pour y injecter des toxines directement dans le cytoplasme. OM : *outside membrane* ; IM : *inside membrane* ; PG : *proteoglycan*

L'appareil de sécrétion est composé d'une première partie en forme d'anneau insérée dans la membrane interne bactérienne, constituée par les protéines PscD, PscR, PscS, PscT, PscT, PscU et PscV, puis d'un second élément, formé d'oligomères de PscC, inséré dans la membrane externe bactérienne.

L'appareil de translocation est constitué d'un polymère de PscC se terminant par la protéine PcrV. Lors du contact bactérie-cellule, deux protéines, PopB et PopD sont transportées depuis le cytoplasme bactérien jusqu'au niveau de la membrane cellulaire pour s'y insérer et former un pore indispensable à la translocation des toxines dans le cytoplasme de la cellule eucaryote.

L'activation naturelle du SSTT se fait au contact des cellules, principalement les cellules de l'immunité et les cellules épithéliales.

➤ **Effecteurs délivrés par le SSTT et rôle dans la virulence de *P. aeruginosa***

• **Toxines**

Quatre toxines sont connues pour être sécrétées par le SSTT : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY.

ExoS et ExoT sont des enzymes à activité GTPase et ADP-ribosyltransferase sur des petites protéines G de la famille Ras. Elles ont une homologie importante et entraînent différentes perturbations du fonctionnement cellulaire, dont l'échappement à la phagocytose (destruction du cytosquelette) et l'induction de la mort cellulaire (62). Des travaux menés précédemment au laboratoire ont permis d'identifier les 54 acides aminés en N-terminal d'ExoS nécessaires à la sécrétion et à la translocation de la toxine (63).

ExoU est une phospholipase dont l'action s'exerce principalement sur les membranes cellulaires, induisant une nécrose de la cellule cible. Cette toxine n'est pas toujours exprimée par *P. aeruginosa*. En l'occurrence, la souche CHA utilisée au laboratoire n'exprime pas cette toxine et bénéficie d'une toxicité réduite.

Exo Y est une adénylate cyclase relativement bien conservée dans les différentes souches de *P. aeruginosa* et ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans l'infection (64).

• **PopB et PopD**

Ces 2 protéines participent à l'ancrage du SSTT à la cellule eucaryote et à la translocation des protéines en formant un pore dans la membrane cellulaire. Une toxicité « pore-forming » (*in vitro*) est d'ailleurs attribuée au complexe PopB/PopD (65). Lors de l'activation artificielle du SSTT par déplétion calcique, elles sont relarguées dans le milieu, de la même manière que les exotoxines.

• **Rôle dans la virulence de la bactérie**

Le SSTT est impliqué dans l'induction de la nécrose et de l'apoptose de diverses populations cellulaires ainsi que dans l'altération de fonctions des phagocytes. Les cellules cibles du SSTT sont principalement les macrophages, les cellules dendritiques, les polynucléaires et les cellules épithéliales. Le contact entre les cellules et la bactérie active le SSTT et entraîne la

libération des effecteurs dans la cellule. La cytotoxicité envers les polynucléaires et les macrophages est clairement dépendante de l'activation du SSTT (66,67). Il s'agit d'un mécanisme de défense naturelle de la bactérie.

➤ **Régulation du SSTT**

Le SSTT est un système hautement régulé qui est activé *in vivo* lors de la phase aiguë de l'infection. Il est connu qu'en cas d'infection chronique le SSTT est régulé négativement, probablement pour échapper à la surveillance du système immunitaire (68).

La translocation des protéines est provoquée par le contact cellules-bactéries et la sécrétion est déclenchée *in vitro* par une déplétion calcique que l'on peut induire en présence d'un chélateur du calcium (EGTA), ce qui permet d'en étudier la fonctionnalité. La présence de sérum dans le milieu de culture semble aussi être un facteur activant le SSTT (60).

L'ensemble des gènes codant les protéines de structure du SSTT et les toxines sécrétées, sont sous la stricte dépendance d'un activateur transcriptionnel : la protéine ExsA. Il s'agit d'un système très complexe de régulation à plusieurs composantes, jouant principalement sur l'inhibition d'ExsA, qui n'est libéré que dans les conditions citées précédemment (69).

2. Travaux précédemment menés au laboratoire

Le SSTT de *Pseudomonas aeruginosa* est étudié depuis des années dans le laboratoire TheREx. Une souche atténuée (délétée des toxines ExoS/ ExoT) a été élaborée pour délivrer des protéines d'intérêt (antigènes) au travers du SSTT. Une séquence minimale d'adressage des protéines d'intérêts a été identifiée. Il s'agit des 54 premiers acides aminés de la protéine ExoS (ExoS54), qui sont ajoutés par génie génétique (voir plasmide pEAI3S54) (63).

➤ **Asservissement du SSTT de *P. aeruginosa***

La sécrétion *in vitro* et la translocation *in vivo* d'une protéine antigénique sont rendues possibles grâce au plasmide pEAI3 S54 (figure 11).

Cette construction plasmidique a été mise au point en plaçant l'activateur transcriptionnel ExsA sous la dépendance d'un promoteur inductible (*ptaq*). En condition non-induite *ptaq*

est couplé au répresseur LacI^Q et la transcription d'*exsA* est inhibée. En présence d'un ligand de LacI^Q (lactose, IPTG), l'inhibition de *ptaq* est levée et la transcription du gène *exsA* peut avoir lieu.

Le gène codant la protéine d'intérêt est cloné à l'aide d'enzymes de restriction en aval de la séquence *ExoS54* ; *ExsA* se fixe au promoteur d'*ExoS* et initie alors la transcription d'*ExoS54*-protéine d'intérêt. De plus, la production d'*ExsA* dans *P. aeruginosa* va permettre l'assemblage du SSTT.

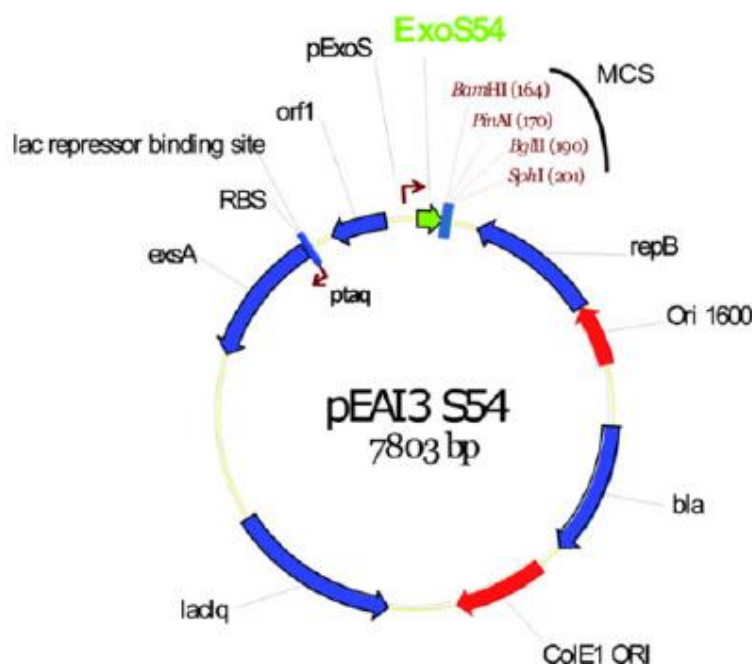


Figure 11 : Plasmide pEAI3 S54. Un gène d'intérêt est cloné en aval de la séquence codant *ExoS54*. La transcription d'*exsA*-protéine d'intérêt est sous la dépendance d'un promoteur inductible à *ExsA*. La production d'*ExsA* est elle-même régulée par un promoteur inductible à l'IPTG (*ptaq*). *orf1* : gène codant la protéine chaperone d'*ExoS* ; RBS : ribosome binding site ; *lacI*^Q : gène codant un mutant du répresseur lac (transcription élevée) ; ColE1 ORI : origine de réplication utilisée par *E.coli* ; *bla* : gène codant la β -lactamase (résistance à l'ampicilline) ; ori 1600 : origine de réplication utilisée par *Pseudomonas* ; *repB* : gène codant la protéine de réplication ; MCS : site de clonage multiple

Les résultats obtenus ont montré que l'addition d'IPTG au milieu de culture d'une souche de *P. aeruginosa* transformée par le plasmide pEAI3 S54 induit la transcription de tous les gènes sous la dépendance d'*ExsA*. La sécrétion/translocation des protéines couplées à *ExoS54* est effective seulement si on effectue une déplétion calcique du milieu de culture en présence d'IPTG, ou lors d'un contact avec une cellule cible. (63)

➤ Détoxification de la souche bactérienne

La souche vaccinale de *P. aeruginosa* a été développée à partir de la souche clinique CHA (66), isolée d'un patient souffrant de mucoviscidose. La production de la toxine ExoU n'est pas retrouvée (le gène *exoU* n'est pas présent), ce qui en fait une souche naturellement moins toxique. Toutefois, les autres effecteurs du SSTT sont exprimés normalement (ExoS, ExoT, ExoY).

Les gènes codant les exotoxines ExoS et ExoT ont été délétés de la souche CHA, donnant naissance à la souche CHA-OST (70) et réduisant ainsi la cytotoxicité de la bactérie de 50 % (mesurée sur des cellules en culture) (63). Enfin d'autres gènes des voies métaboliques (tel que *aroA*) ou participant à la virulence de la bactérie, tels que *lasI* et *rhII* (gènes du *Quorum Sensing*), ont été ciblés pour obtenir les souches peu toxiques CHA-OA, CHA-OAL et CHA-ORL (71).

➤ Optimisation de l'efficacité du vecteur

Le développement de ces différentes souches comme vecteurs d'immunothérapie antitumorale a été effectué ces dernières années et leur efficacité a été démontrée à la fois en modèle de mélanome et de glioblastome murins (63,72).

Comme nous l'avons vu précédemment la particularité du vecteur *P. aeruginosa* par rapport aux stratégies d'immunothérapie conventionnelles est qu'il possède la capacité grâce au SSTT d'injecter des antigènes directement dans les cellules eucaryotes, y compris dans les cellules dendritiques. Les peptides antigéniques sont présentés aux lymphocytes T CD8+ grâce aux molécules de CMH I et aux T CD4+ via le CMH II (figure 12). Ce vecteur possède également la faculté d'induire un signal de danger par le biais de la stimulation des PRRs, propice à la rupture de tolérance immunitaire vis-à-vis de l'antigène injecté.

Cette réponse lymphocytaire peut être améliorée et amplifiée en modifiant plusieurs paramètres qui ont été étudiés au laboratoire (73). La séquence PADRE (PAn HLA-DR Epitope), un épitope universel CMH II humain et murin, a notamment été ajoutée en aval de la séquence *exoS54* pour favoriser la réponse T helper (74).

D'autre part un plasmide pEAi3 S54 capable d'exprimer 2 antigènes a été développé et le schéma de vaccination a été optimisé pour obtenir une réponse forte et durable (réponse mémoire)(73).

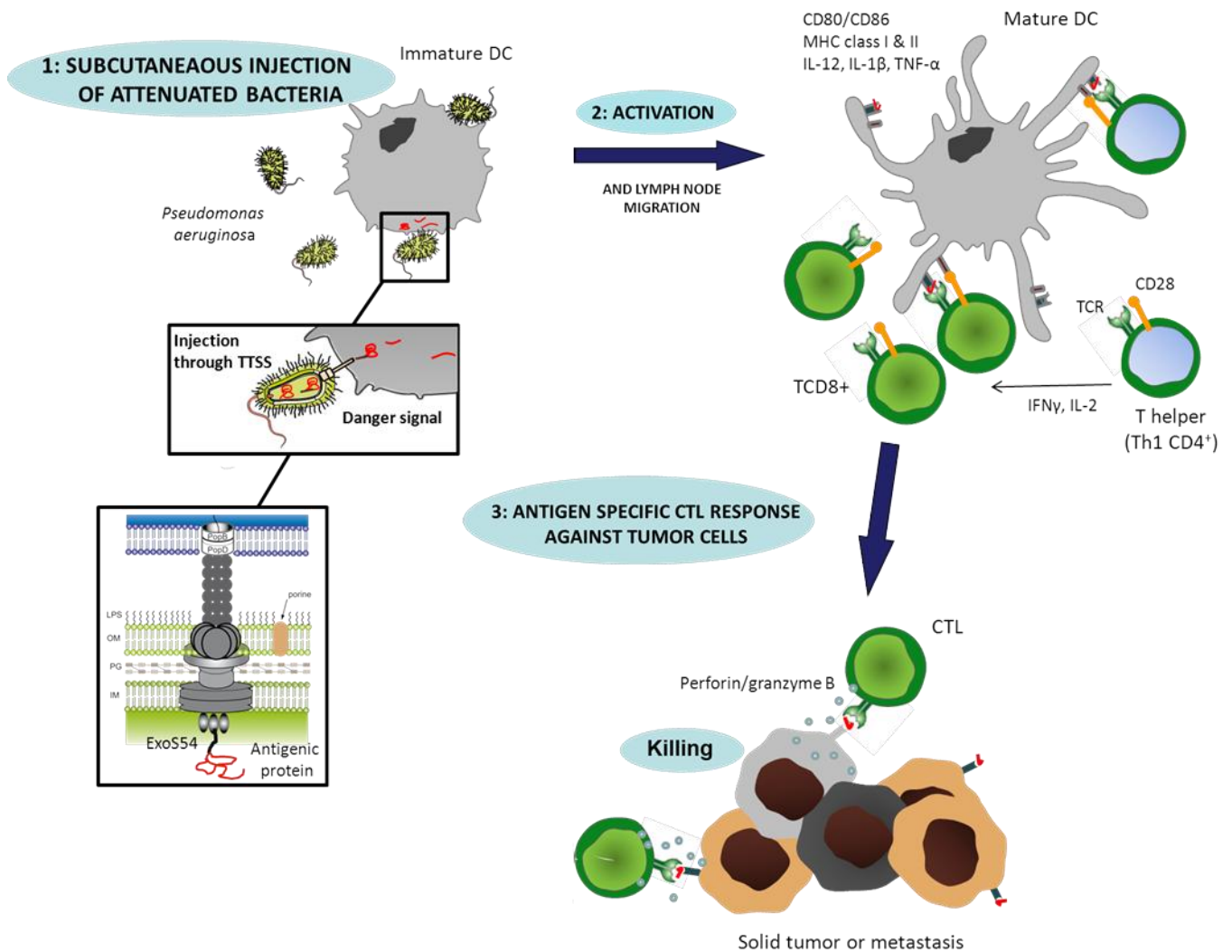


Figure 12 : Concept de l'immunothérapie antitumorale utilisant le SSTT de *P. aeruginosa*

E. Sécurisation de la souche vaccinale

1. Quels sont les besoins en termes d'atténuation ?

L'injection du vecteur bactérien atténué dans le cadre d'un futur traitement antitumoral peut être associée à des complications plus ou moins sévères chez des patients déjà fragilisés par leur cancer. Les principaux risques sont la multiplication et la dissémination de la souche dans l'organisme (infection) et dans l'environnement (contamination des populations et dissémination environnementale).

L'utilisation de vecteurs bactériens est réglementée depuis peu par les agences de régulation (ANSM, EMEA), qui classifie ce genre de traitement dans « les médicaments de thérapie innovante ou de thérapie génique ». Ces traitements s'apparentent à une vaccination thérapeutique qui est encore peu représentée sur le marché. De plus, il s'agit dans la majorité des cas d'organismes génétiquement modifiés qui requièrent une autorisation du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) pour être utilisés et développés.

Les travaux réalisés au laboratoire pour atténuer la toxicité du vecteur ont finalement conduit à un déclassement des souches CHA-OA et CHA-OAL en classe 1 (non pathogènes) des organismes génétiquement modifiés (validé par le HCB). Cette décision autorise leur manipulation en lieu de confinement peu contraignant et « valide » en quelque sorte l'innocuité de ces souches. Toutefois, il est nécessaire de ne pas atténuer excessivement la toxicité de la souche qui contribue en grande partie à l'efficacité de la réponse immune, et ceci en provoquant une réponse inflammatoire locale indispensable à l'activation de l'immunité adaptative.

Idéalement, nous devons produire une souche conservant à la fois ses propriétés immunostimulantes et de vecteurs d'antigènes, et dont l'atténuation de la virulence s'effectue par l'inactivation de la réplication de la bactérie. Nous sécuriserons ainsi l'utilisation du vecteur en thérapeutique tout en limitant les risques de dissémination dans l'environnement. Enfin ce type de souche vectrice devrait être plus facilement accepté par les instances réglementaires.

2. Le concept des bactéries « Killed But Metabolically Active »

Brockstedt *et al.* ont mis au point une nouvelle classe de vaccins basée sur un traitement photochimique utilisé pour inactiver les pathogènes et les cellules nucléées des prélèvements plaquettaires et plasmatiques humains (75). Ce procédé a été repris par plusieurs équipes pour développer des vaccins anti-infectieux (76–79).

➤ Principe du traitement photochimique et application

Le concept INTERCEPT Blood System®, développé par Cerus Corporation, permet d'inactiver les contaminants bactériens, viraux et cellulaires dans les préparations de concentrés plaquettaires ou de produits plasmatiques, par l'utilisation conjointe de psoralène S-59 (amotosalène-HCl, Intercept Blood System®, Cerus corporation) et d'UVA (rayons ultraviolets de grandes longueurs d'onde). Le psoralène S-59 (amotosalène) synthétique a la particularité d'être hautement réactif et moins toxique que le psoralène.

Il s'agit d'une molécule qui a pour propriété de se fixer aux bases pyrimidiques de l'ADN et de l'ARN. Des pontages covalents irréversibles vont se former lors d'une exposition du milieu à des rayons ultraviolets de grande longueur d'onde (UVA). Ce traitement photochimique entraîne l'inactivation de la réplication cellulaire et bloque par conséquent la prolifération des différents contaminants (figure 13).

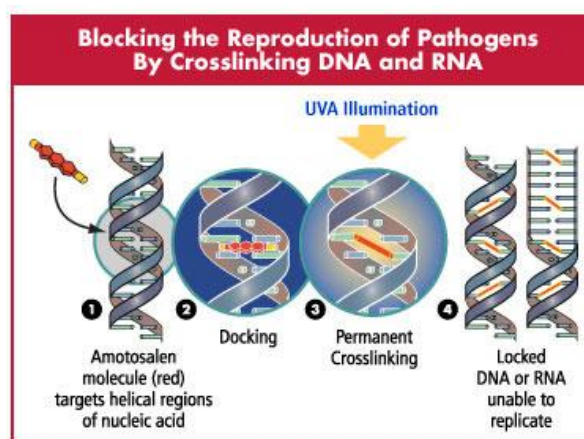


Figure 13 : Principe du traitement photochimique (d'après Cerus Corporation. www.cerus.com)

L'efficacité du système a été validée pour de nombreuses bactéries, notamment *P. aeruginosa* ; les résultats sont résumés dans le tableau 4.

Espèces bactériennes testées avec INTERCEPT Blood System	Étendue de l'inactivation* (réduction log ₁₀)	
	Plaquettes suspendues dans du plasma/solution additive	Plaquettes suspendues dans du plasma
Bactéries Gram-négatives		
<i>Escherichia coli</i>	>6,4	≥7,3
<i>Serratia marcescens</i>	>6,7	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>5,6	≥6,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,5	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	>6,2	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	>5,9	>7,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	5,9	-
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (agent de l'EGH)**	-	>4,2
Bactéries Gram-positives		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>6,6	>7,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,6	>7,6
<i>Streptococcus pyogenes</i>	>6,8	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	>6,3	-
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	>6,3	-
<i>Bacillus cereus</i> (dont les spores)	3,6	-
<i>Bacillus cereus</i> (état végétatif)	>6,0	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	>6,5	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	>6,7	-
<i>Lactobacillus species</i>	>6,9	-
<i>Clostridium perfringens</i> (état végétatif)	>7,0	-
Bactérie spirochète		
<i>Treponema pallidum</i> (syphilis)	≥6,8 à ≤7,0	>5,9
<i>Borrelia burgdorferi</i> (maladie de Lyme)	>6,8	>10,6

* « > » : inactivation en dessous de la limite de la détection du dosage

** : intracellulaire

« - » signifie non testé.

Tableau 4 : Inactivation des bactéries par Intercept Blood System®. Traitement photochimique appliqué: 150µM de psoralène S-59 et 3J/cm² d'UVA.

➤ « Détournement de PCT »

En réponse aux pontages multiples induits par un traitement photochimique, on observe une activation de la voie NER (Nucleotide Excision Repair), permettant la réparation de l'ADN et de l'ARN via l'exonucléase ABC de la bactérie. L'exonucléase ABC est constituée de 3 sous-unités protéiques indissociables A, B et C codées par les gènes *uvrA*, *uvrB* et *uvrC* (*ultraviolet-light response genes*) (80).

Le concept des vaccins KBMA est basé sur l'idée que des mutants bactériens délétés pour les gènes codant 2 sous-unités de l'exonuclease ABC (*uvrA* et *uvrB*) sont beaucoup plus sensibles au traitement photochimique et ainsi plus facilement inactivables. En effet, une faible exposition des mutants au PCT serait corrélée à l'apparition de rares pontages de psoralène S-59 sur l'ADN permettant de conserver intacte l'expression du génome et du protéome, tout en bloquant la réplication bactérienne (77). En théorie un seul pontage dans l'ADN suffirait à bloquer la réplication de la bactérie.

Brockstedt *et al.* ont montré l'innocuité et l'efficacité de ce vecteur bactérien KBMA en immunothérapie antitumorale et anti-infectieuse avec la bactérie *Listeria monocytogenes* (77,81). Le procédé a été ensuite appliqué et validé sur *Salmonella typhimurium* et *Bacillus anthracis* pour le développement de vaccins anti-infectieux (78,79).

3. Objectifs du travail

Pour rendre plus sûre l'utilisation du vecteur produit au laboratoire, nous avons envisagé la mise au point d'une 2^{ème} génération de souches bactériennes vaccinales dites « tuées mais métaboliquement actives » (KBMA). Cette technique nous permettrait d'obtenir des bactéries, capables de produire la protéine antigénique et de la vectoriser mais incapables de se répliquer chez l'hôte et dans l'environnement ; donc d'une utilisation à niveau de risque le plus bas (82).

Le travail présenté ici a consisté à produire et à débiter la caractérisation de cette nouvelle souche KBMA comme outil de vectorisation d'antigène. Plusieurs étapes ont été nécessaires:

- La réalisation d'une inactivation de gène par une technique de biologie moléculaire maîtrisée au laboratoire.
- La mise au point et l'optimisation du traitement photochimique sur les souches mutées
- Le contrôle de l'activité métabolique des souches KBMA *in vitro*.
- Les tests préliminaires de toxicité et d'efficacité vaccinale *in vivo* en modèle murin.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Souches bactériennes et plasmides

Souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Résistance antibiotique	Génotype/Phénotype	Reference
CHA-OST	-	CHA ΔexoS Δorf1 ΔexoT	[70]
CHA-OA	-	CHA ΔexoS Δorf1 ΔexoT ΔaroA	[71]
CHA-OAL	gentamycine	CHA ΔexoS Δorf1 ΔexoT ΔaroA $\Delta\text{lasI}::\text{Gm}$	[71]
CHA-OAL	-	CHA ΔexoS Δorf1 ΔexoT ΔaroA ΔlasI	Ce travail
CHA-OST ΔuvrA	gentamycine	CHA ΔexoS Δorf1 ΔexoT $\Delta\text{uvrA}::\text{Gm}$	Ce travail
CHA-OST ΔuvrA	-	CHA ΔexoS Δorf1 ΔexoT ΔuvrA	Ce travail
CHA ΔuvrA	gentamycine	CHA $\Delta\text{uvrA}::\text{Gm}$	Ce travail
CHA ΔuvrA	-	CHA ΔuvrA	Ce travail
CHA-OST ΔuvrAB	gentamycine	CHA ΔexoS Δorf1 ΔexoT ΔuvrA $\Delta\text{uvrB}::\text{Gm}$	Initiée dans ce travail
CHA-OST ΔuvrAB	-	CHA ΔexoS Δorf1 ΔexoT ΔuvrA ΔuvrB	Initiée dans ce travail
CHA-OAL ΔuvrA	-	CHA ΔexoS Δorf1 ΔexoT ΔaroA ΔlasI ΔuvrA	Ce travail
CHA-OST ΔuvrA pEI13 S54-PADRE-OVA	ampicilline	CHA ΔexoS Δorf1 ΔexoT ΔuvrA transformée par le plasmide pEI1 S54-PADRE-OVA	Ce travail
CHA-OST ΔuvrAB pEI13 S54-PADRE-OVA	ampicilline	CHA ΔexoS Δorf1 ΔexoT ΔuvrA ΔuvrB transformée par le plasmide pEI1 S54-PADRE-OVA	Initiée dans ce travail
Souche <i>Escherichia coli</i>	Résistance antibiotique	Génotype/Phénotype	Reference
S17-1	-	Rp-4-2tc::Mu aph::TN7 <i>recA</i> [SmR]	-

Plasmide	Résistance antibiotique	Caractéristiques	Reference
pEI13 S54-PADRE-OVA	ampicilline	Vecteur contenant la séquence d'AA 234-386 du gène de l'ovalbumine	[63]
pEX100Tlink $\Delta\text{HindIII}$	ampicilline	pEX100Tlink avec polylinker (sans le site <i>HindIII</i>)	[70]
pEX100T mut <i>uvrA</i>	gentamycine ampicilline	Clonage dans pEX100Tlink $\Delta\text{HindIII}$ de la cassette de résistance à la gentamycine encadrée par deux séquences <i>lox</i> et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène <i>uvrA</i>	Ce travail
pEX100T mut <i>uvrB</i>	gentamycine ampicilline	Clonage dans pEX100Tlink $\Delta\text{HindIII}$ de la cassette de résistance à la gentamycine encadrée par deux séquences <i>lox</i> et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène <i>uvrB</i>	Ce travail
pCM157	tetracycline	Contient la séquence codant la recombinaison <i>cre</i>	[84]

Tableau 5 : Souches bactériennes et plasmides utilisés dans ce travail

B. Manipulation des bactéries

1. *Pseudomonas aeruginosa*:

➤ Culture

Certaines des souches utilisées dans ce travail (CHA, CHA-OST) sont des pathogènes nécessitant une manipulation en laboratoire P2, avec des règles strictes de confinement. La culture se fait en milieu liquide riche (milieu LB) à 37°C sous agitation constante. La cinétique de croissance est contrôlée par la mesure de la densité optique (DO) à 600nm ; une unité de DO_{600nm} correspond à 5.10⁸ bactéries par millilitre de milieu.

La culture sur milieu solide peut être réalisée sur milieu LB-Agar ou sur milieu PIA (*Pseudomonas Isolation Agar*®, Difco).

Les milieux cités précédemment sont stérilisés par autoclavage avant utilisation.

Concentrations des antibiotiques utilisés pour la sélection :

- Carbénicilline : 300 µg/ml en milieu liquide, 600 µg/ml en milieu solide
- Gentamicine : 200 µg/ml en milieu liquide, 400 µg/ml en milieu solide
- Tétracycline : 250 µg/ml en milieu liquide et solide

➤ Transformation par un plasmide

A partir d'une culture O/N en milieu liquide, les bactéries sont centrifugées puis lavées 2 fois dans une solution de sucrose 300 mM et remises en suspension dans cette même solution. Les bactéries sont ensuite incubées 30 minutes sur glace avec environ 25 ng d'ADN plasmidique, puis soumises à électroporation (application d'un courant de 1800V pendant 5 ms) dans une cuvette adaptée (système ElectroCell Manipulator ECM399 BTX, Genetronic Inc, San Diego, CA).

Enfin les bactéries sont remises en culture 1 heure en milieu LB liquide avant étalement sur milieu solide, contenant l'agent de sélection approprié au gène de résistance porté par le plasmide.

2. *Escherichia coli*

La souche DH5α library efficiency (Invitrogen) a été utilisée pour l'élaboration des plasmides (clonage) et la souche S17-1 (tableau 1) pour la conjugaison biparentale avec *P. aeruginosa*.

➤ Culture

La culture se fait en milieu liquide dans LB à 37°C sous agitation et en milieu solide sur LB-agar.

Concentrations des antibiotiques utilisés pour la sélection: (milieu solide et liquide)

- Ampicilline : 100 µg/ml
- Gentamicine : 10 µg/ml
- Tétracycline : 20 µg/ml
- Kanamycine : 50 µg/ml

➤ Transformation d'*E. coli* par un plasmide

Immédiatement après décongélation, les bactéries sont incubées sur glace pendant 15 minutes avec un plasmide ou un produit de ligation. Un choc thermique de 30 secondes à 42°C est effectué, puis les bactéries sont laissées 2 minutes sur glace avant d'être mises en culture dans du milieu LB liquide pendant 1 heure. On étale finalement les bactéries sur boîte LB-agar contenant l'antibiotique de sélection correspondant à la résistance portée par le plasmide.

C. Mutagenèse par échange allélique basée sur le système de recombinaison *cre-lox*

Nous avons utilisé la méthode élaborée au laboratoire par L. Quénée, qui permet la mutation successive de différents gènes grâce à l'absence finale de marqueur de sélection (70). Cette technique consiste à déléter un gène d'intérêt par échange allélique et le

remplacer par une séquence d'ADN codant un marqueur de sélection (gentamicine dans le cas présent).

Les mutants CHA-OST Δ uvrA puis CHA-OST Δ uvrAB ont été générés à partir de la souche de *P. aeruginosa* atténuée CHA-OST (délétée pour gènes codant les exotoxines ExoS et ExoT) produite précédemment au laboratoire (tableau 5).

➤ **Elaboration du plasmide d'échange allélique**

Le plasmide pEX100Tlink (figure 14) possède un site de clonage avec différents sites de restriction ainsi que 2 gènes de sélection conférant à la fois une résistance à l'ampicilline (*bla*) et une sensibilité au saccharose (*sacB*) aux bactéries transformées. Une origine de réplication pour la bactérie *E.coli* est présente dans la construction mais a été volontairement retirée pour *P. aeruginosa* (vecteur suicide).

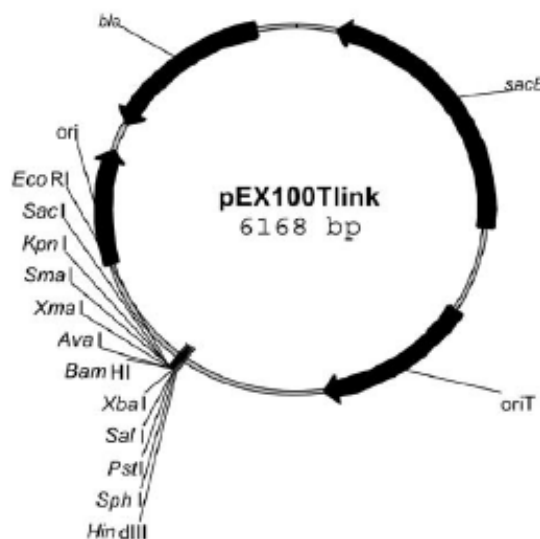


Figure 14 : Plasmide de mutagenèse pEX100Tlink. *Bla3* (β -lactamase de type 3) code la résistance à l'ampicilline et à la carbenicilline. Le gène *sacB* confère à la souche une sensibilité à un métabolite toxique du sucrose lorsque la souche croît sur milieu LB-sucrose 5%. *oriT* est l'origine de transfert et *ori* correspond à l'origine de réplication du vecteur chez *E. coli*.

En pratique, il faut définir la séquence que l'on souhaite éliminer du génome de la bactérie. On amplifie alors des fragments de 1000pb environ correspondant aux régions immédiatement adjacentes en amont et en aval du gène d'intérêt. Ces séquences sont amplifiées par PCR à partir d'ADN génomique de *P. aeruginosa* et à l'aide des amorces décrites dans le tableau 6. Les amorces ont été conçues à partir du génome de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 (AE004740) publié dans la base de données www.pseudomonas.com

(83). La souche PAO1 est génétiquement très proche de la souche CHA que nous utilisons au laboratoire.

Gène	Sens de l'amorce	Séquence de l'amorce	
		Région flanquante en 5' du gène	Région flanquante en 3' du gène
<i>uvrA</i>	Sens	GTAAGCTTGCCGAGATGCCCCAGTCGCA	CTGAATTCGGCCCCCTCGTGACCACT
	Antisens	CTGAATTCGGCGGACCACTGGAACCACC	GTAAGCTTGCGCCCCACGAATCAGGATC
<i>uvrB</i>	Sens	GAATTCGCGCAGCGTCTGGATCT	AAGCTTGTGTTGTTGCGCAGGTA
	Antisens	AAGCTTCATCGAGCAGGTGGTGCG	GGATCCTGGCGTCACAGCTCC
Gène	Sens de l'amorce	Séquence de l'amorce	
<i>uvrA</i>	Sens	CCTCATGGAAGAAACCGCTG	
<i>contrôle</i>	Antisens	CTGAATTCGGCGGACCACTGGAACCACC	
<i>uvrB</i>	Sens	AGGGTAGTCACCAGCACCC	
<i>contrôle</i>	Antisens	GATGTGATCGACATCTTCCC	

Tableau 6 : Amorces pour l'amplification des séquences utilisées pour la délétion des gènes *uvrA* et *uvrB* et pour la vérification des mutants obtenus.

Les séquences sont insérées (en conservant le même ordre que sur le génome) dans le plasmide pEX100Tlink. Enfin la séquence du gène de résistance à la gentamicine *aacC1*, encadrée des deux séquences *lox* que reconnaîtra ultérieurement la recombinaise *cre*, est insérée entre les 2 fragments. On obtient ainsi les plasmides pEX100T mut *uvrA* et pEX100T mut *uvrB*. Après transformation dans les bactéries compétentes *E.coli* DH5 α , les souches positives sont sélectionnées par gentamicine sur milieu LB solide et les plasmides contrôlés par digestion enzymatique, suite à une extraction de l'ADN plasmidique.

➤ Conjugaison biparentale avec le plasmide pEX100T mut *uvrA*

L'introduction du plasmide dans la souche CHA-OST se fait ensuite par conjugaison biparentale avec une souche d'*E. coli* S17-1 transformée par le plasmide pEX100T mut *uvrA*. Pour ce faire, les souches CHA-OST et *E. coli* S17-1 transformée sont cultivées séparément en milieu LB et LB-Gm respectivement, jusqu'en phase de croissance exponentielle, puis un mélange des 2 cultures (50 μ L de chaque) est déposé sous forme de goutte sur un milieu solide LB sans NaCl (l'absence de NaCl favorise la conjugaison).

Après 24h, la culture obtenue est prélevée et reprise dans 1ml de milieu LB. 100 μ L de cette suspension sont étalés sur milieu solide PIA-Gm puis incubés O/N à 37°C. Seules les clones

CHA-OST qui ont reçu le plasmide pEX100T mut *uvrA* lors de la conjugaison pourront croître sur le milieu PIA-Gm. Cependant il peut se produire une simple ou double recombinaison lors de l'échange allélique.

➤ Sélection des double-recombinants

Les colonies ayant réalisé une simple ou double recombinaison sont ensuite sélectionnées et repiquées sur différents milieux : PIA-Gm, PIA-sucrose 5% et PIA-Cb.

En cas de simple recombinaison, seule une des deux régions flanquantes a fait l'objet d'une recombinaison, avec deux conséquences :

- La séquence du plasmide est incorporée au chromosome, y compris les séquences *sacB* et *bla3* (conférant une résistance à la carbenicilline et une sensibilité au sucrose 5 %)
- La séquence du gène non mutée est toujours sur le chromosome.

En cas de double recombinaison, l'échange allélique est obtenu sur les deux régions flanquantes, et la séquence cible a été excisée et remplacée par le gène de résistance à la gentamicine.

Seuls les mutants Gm^r, Cb^s, Sucrose^r, correspondant aux double-recombinants sont conservés. Une PCR sur ADN génomique est réalisée systématiquement afin de valider le double-recombinant obtenu.

➤ Excision de la cassette de résistance

Le mutant a intégré dans son génome la cassette de résistance à la gentamicine *aacC1* flanquée des séquences *lox* « en remplacement » du gène d'intérêt (figure 15). Afin de ne pas conserver une souche résistante à la gentamicine, le plasmide pCM157 (tableau 1, (84)) est intégré dans la souche mutée par électroporation. Ce plasmide contient les gènes de résistance à la tétracycline et le gène codant la recombinaise *Cre*. Cette enzyme effectue une recombinaison entre les séquences *lox* permettant de supprimer le gène *aacC1* et donc de perdre la résistance à la gentamicine (résumé figure 15).

Les bactéries transformées par ce plasmide sont sélectionnées O/N sur PIA-Tc puis cultivées en milieu LB liquide 48h O/N et O/D avec un repiquage toutes les 12 heures afin de favoriser

la perte du plasmide pCM157 (et ainsi la perte de la résistance à la tétracycline). Enfin une PCR sur ADN génomique est effectuée ainsi qu'une culture en milieu LB-Gm (où les bactéries ne doivent pas pousser) pour « valider » le mutant CHA-OST Δ *uvrA* et la suppression de la cassette de résistance à la gentamicine.

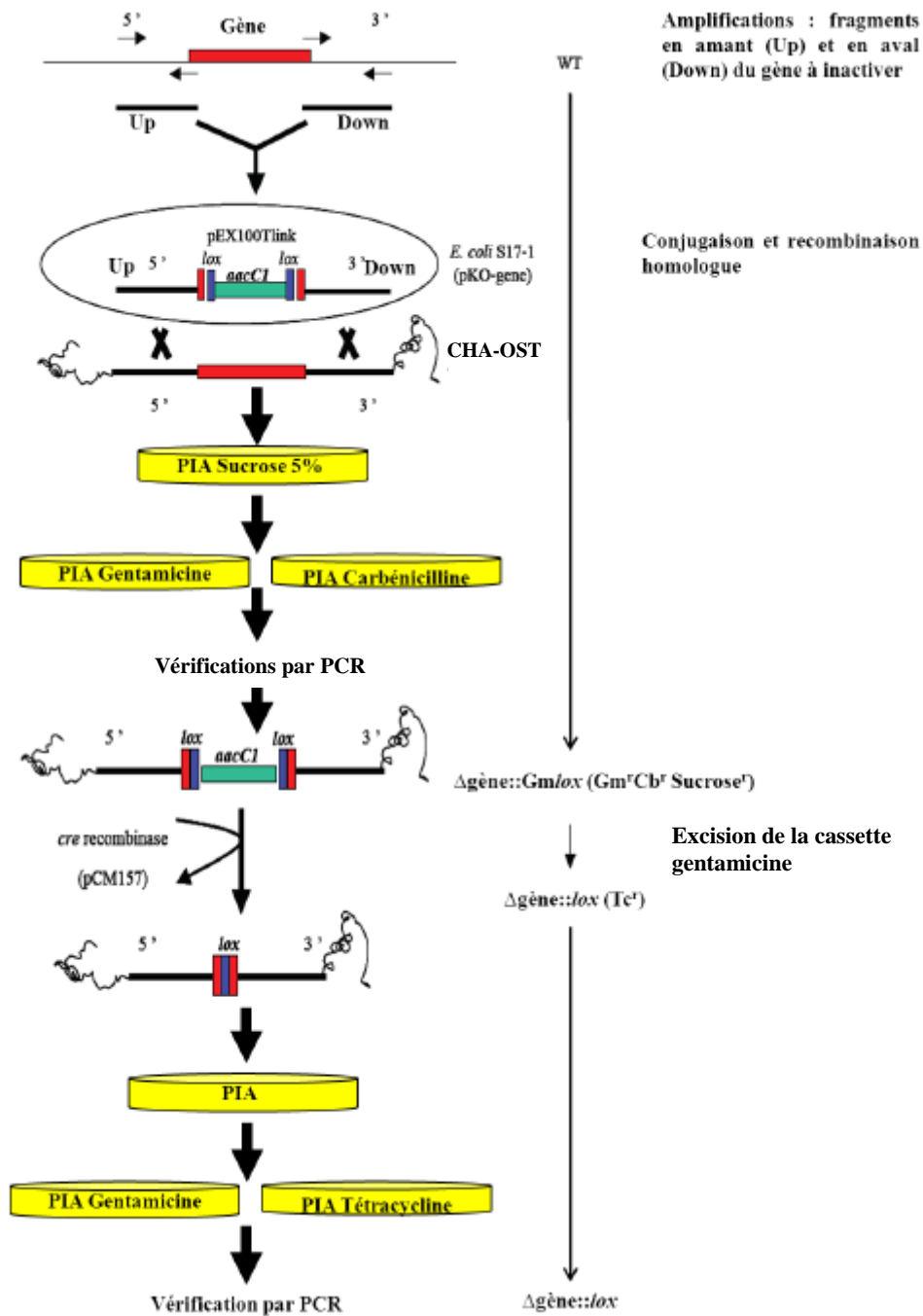


Figure 15 : Mutagenèse par échange allélique et élimination du marqueur de sélection. L'échange allélique conduit à une insertion de la cassette de résistance à la gentamicine *aacC1* flanquée des séquences *lox* dans le génome de la bactérie. La suppression de cette cassette de résistance est ensuite effectuée par l'introduction du plasmide pCM157 exprimant la *cre* recombinase. La méthode peut ainsi être utilisée plusieurs fois pour produire différentes délétions de gènes.

Cette mutagénèse peut alors être répétée pour un autre gène d'intérêt (délétion *uvrB* à la suite de la délétion *uvrA*).

D. Mise au point du traitement photochimique (PCT) pour obtenir la souche *P. aeruginosa* CHA-OST KBMA

L'objectif de ce traitement est d'abolir la réplication bactérienne tout en maintenant l'activité métabolique de la souche. On réalise des pontages covalents dans l'ADN de la bactérie à l'aide de l'amotosalène (psoralène S-59, Intercept Blood System®, Cerus corporation), et d'une exposition aux UV de grandes longueurs d'onde (UVA : 320-400 nm), rendant les pontages dans l'ADN irréversibles (77).

Les bactéries sont mises en culture la veille à 37°C sous agitation dans du milieu LB puis diluées le lendemain dans LB à une $DO_{600} = 0,2$. A DO_{600nm} de 0,5, une concentration déterminée d'amotosalène est ajoutée puis les bactéries sont à nouveau cultivées jusqu'à DO_{600nm} de 1.

On transfère ensuite 1ml de culture dans une plaque de culture cellulaire 6 puits (Greiner Bio one®) que l'on expose aux UVA à l'aide d'un crosslinker Bio-link® (Vilber Lourmat). Afin de déterminer le traitement optimal, les cultures sont exposées à différentes énergies (en joules/cm²) et plusieurs concentrations d'amotosalène.

Les bactéries sont finalement centrifugées puis lavées par du milieu LB. On dépose différentes dilutions sur milieu PIA O/N à 37°C pour déterminer le nombre de colonies/ml, correspondant au nombre de bactéries résiduelles ayant conservé une activité répliquative après traitement photochimique.

E. Activité métabolique de CHA-OST KBMA : test de sécrétion d'un antigène vaccinal par le système de sécrétion de type III

L'ovalbumine, ou une partie de la protéine (OVA), est fréquemment utilisée comme antigène vaccinal dans des modèles de tumeurs expérimentaux exprimant l'ovalbumine. Elle permet d'étudier l'immunothérapie sur une tumeur pour laquelle aucun antigène n'est caractérisé et elle facilite l'évaluation de l'immunogénicité d'un antigène dans un modèle de tumeur déjà

caractérisé. Enfin l'intérêt est que l'on connaît l'épitope dominant CMH I H2K^b (SIINFEKL, souris C57BL/6J) de l'ovalbumine et que de nombreux outils ont été développés en immunologie pour reconnaître le CMH I H2K^b couplé à ce peptide spécifique (clones lymphocytaires T spécifiques, tétramères...)

1. Sécrétion de la protéine de fusion S54-PADRE-OVA par le SSTT (63)

La souche CHA-OST Δ uvrA transformée par le plasmide pEAI3S54-PADRE-OVA est mise en culture dans du LB-Cb à 37°C sous agitation O/N. Les bactéries sont ensuite centrifugées puis repiquées à une DO_{600nm} de 0,2 dans LB-Cb supplémenté par IPTG 0,5mM.

A une DO_{600nm} = 0,5, une concentration déterminée d'amotosalène est ajoutée directement dans la culture, puis à DO_{600nm} = 1, on expose les bactéries aux UVA à une énergie choisie.

Après une étape de centrifugation les bactéries sont lavées par du milieu LB puis mises en culture 3 heures à 37°C sous agitation dans du milieu LB-Cb, 0,5mM IPTG, 5mM EGTA et 20mM MgCl₂ afin d'induire la sécrétion par le SSTT (l'ajout d'ions Mg²⁺ apporte les ions divalents capable de pallier l'absence des ions Ca²⁺, induite par la déplétion calcique).

2. Etude du surnageant par SDS-PAGE

Les surnageants de culture sont prélevés après centrifugation pendant 15 minutes à 10000g et traités par PCA 15% (acide perchloroacétique) O/N à 4°C afin d'obtenir la précipitation des protéines.

Deux étapes successives de centrifugation de 30 minutes (30000g) à 4°C après lavage à l'acétone -20°C sont effectuées. Enfin après évaporation, les protéines sont reprises dans 50μL de tampon dénaturant et traitées 5 minutes à 95°C. Une analyse par SDS-PAGE est ensuite réalisée sur gel gradient 4-15% (Ready gel[®], Biorad) avec une migration à 110V dans un tampon Tris Glycine (Biorad), puis une coloration au bleu de Coomassie.

La taille correspondant à la protéine de fusion S54-PADRE-OVA sécrétée est de 22kDa.

Les contrôles négatifs et positifs sont respectivement représentés par une culture bactérienne similaire sans PCT puis tuée par la chaleur (100°C, 20minutes) et par une culture n'ayant pas subi de PCT et dont la sécrétion a été activée. Cette dernière culture est

conservée à température ambiante sur la paillasse pendant la durée de l'exposition aux UVA puis la sécrétion est induite en même temps que les souches traitées.

F. Test de présentation des CD injectées par l'antigène S54-PADRE-OVA

Les cellules dendritiques (10^5 cellules) issues de la moelle osseuse (BMDC) de souris C57BL/6J sont cultivées O/N dans du milieu RPMI (supplémenté avec 10% SVF, 2mM glutamine), puis mises en contact pendant 3 heures à 37°C et 5% CO₂ avec $5 \cdot 10^5$ bactéries (MOI 5:1) non traitées, traitées par PCT ou tuées par la chaleur (HK).

La préparation des bactéries est similaire à l'expérience précédente mais sans ajout d'EGTA après PCT, afin de ne pas activer la sécrétion dans le milieu de culture. A la fin du traitement, les différentes souches sont remises en suspension, à la concentration adéquate, dans du milieu de culture cellulaire (sans antibiotique) avant interaction avec les BMDC.

Lors du contact avec les BMDC, les bactéries dont le SSTT est fonctionnel vont injecter la protéine de fusion S54-PADRE-OVA. Les BMDC seront activées suite à la présence d'un signal de danger bactérien et présenteront le peptide *SIINFEKL*, issu de la dégradation de l'antigène OVA par le protéasome, sur leur CMH I.

Après ajout de 250 µg/ml de gentamicine pendant 30min pour tuer les bactéries, les surnageants de culture sont éliminés. Les BMDC activées, et présentant le peptide, sont ensuite incubées en présence des cellules B3Z avec un ratio de 1:3. B3Z est un hybridome entre la lignée murine Z8, qui possède le gène de la β-galactosidase sous le contrôle du promoteur minimal de l'IL-2, et la lignée B3, qui est un clone lymphocytaire T CD8+ spécifique du peptide *SIINFEKL* de l'ovalbumine (OVA₂₅₇₋₂₆₄) présenté par les molécules H-2K^b (équivalent du CMH I exprimées par les BMDC de souris C57BL/6) (85).

L'interaction du TCR de l'hybridome B3Z avec le couple H-2K^b-*SIINFEKL* déclenche l'activation transcriptionnelle du promoteur *NF-AT* (*nuclear factor of activated T cells*) qui stimule non seulement la production d'IL-2 au sein de la cellule, mais aussi l'expression de *lacZ*. *lacZ* déclenche la synthèse de la β-galactosidase qui peut être visualisée et quantifiée après lyse des B3Z en présence d'un substrat chromogénique, le CPRG. La quantité de CPRG

modifiée, mesurée à 570nm, permet d'apprécier la présentation de *SIINFEKL* par une cellule présentatrice d'antigène et aussi d'estimer son activation par le vecteur bactérien.

G. Test de cytotoxicité de la souche KBMA sur les macrophages murins J774

Les macrophages murins J774 (fournis par Christian Villiers ; Institut d'oncologie/développement Institut Albert Bonniot, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9) sont mis en culture O/N dans du milieu DMEM Glutamax® (supplémenté avec 10% de SVF).

10^5 macrophages J774 / puits sont distribués dans une plaque 96 puits puis on laisse adhérer les cellules 4h à 37°C et 5% de CO₂.

Les bactéries produites (production similaire à l'expérience précédente) sont lavées puis reprises dans le milieu de culture cellulaire et mises en contact pendant 3h avec les macrophages à une MOI de 5:1 dans un *candle jar* à 37°C (volume final = 200µl).

En fin d'incubation, 250µg/ml de gentamicine sont ajoutés pour éliminer les bactéries (30 minutes de contact). La plaque est centrifugée puis on transfère 100µl de surnageant dans une nouvelle microplaque.

La cytotoxicité des bactéries envers les macrophages est déterminée après mesure du relargage de la LDH dans le surnageant de culture des cellules infectées à l'aide d'un kit de détection (Cytotoxicity Detection Kit (LDH)®, ROCHE).

Le contrôle négatif est représenté par des macrophages non infectés et le contrôle positif par ces mêmes cellules lysées par Triton X100 1%.

Le pourcentage de cytotoxicité est défini selon l'équation suivante : (valeur expérimentale - valeur du contrôle négatif) / (valeur du contrôle positif - valeur du contrôle négatif) x 100

H. Etude de toxicité *in vivo* chez la souris

Une expérience de toxicité du vecteur *in vivo* chez des souris femelles C57BL/6J (Janvier SA) âgées de 6-8 semaines a été effectuée. Les souris reçoivent par voie sous-cutanée, dans le flanc droit 5.10^6 , 5.10^7 ou 5.10^8 bactéries CHA-OST KBMA pEAI3S54-PADRE-OVA dans un volume final de 100µL de PBS. On observe leur état clinique tous les 2 jours.

I. Détermination par immunomonitoring de la dose vaccinale efficace *in vivo* en modèle murin

L'ELISpot (*Enzyme-Linked Immunosorbent Spot*) est une technique immunoenzymatique permettant de dénombrer des cellules à partir de leur sécrétion de cytokines.

Nous souhaitons quantifier la réponse spécifique des lymphocytes T CD8+ après vaccination vis-à-vis du peptide *SIINFEKL* de l'ovalbumine.

Pour ce faire, des souris C57BL/6J naïves sont vaccinées par 2 injections à 7 jours d'intervalle (J-14 et J-7) avec différentes souches et à différentes doses (tableaux 7 et 8). A J0, les souris sont sacrifiées puis on prélève la rate et on en extrait les splénocytes.

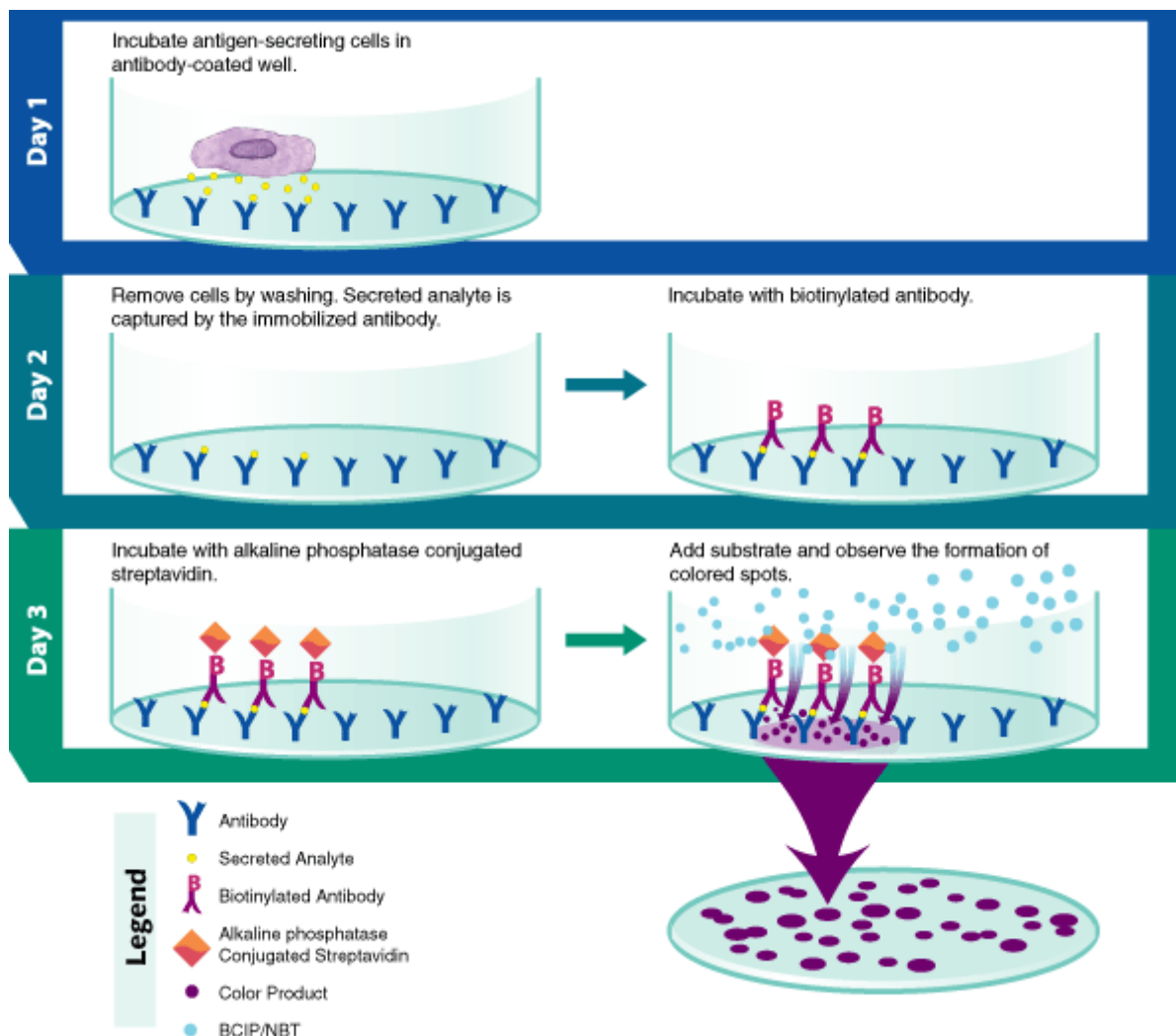


Figure 16 : Principe du test ELISpot. Le peptide épitope *SIINFEKL* stimule les cellules T CD8+ spécifiques du peptide qui sécrètent de l'IFN γ . On quantifie les spots correspondant aux cellules sécrétant de l'IFN γ .

On distribue 4.10^5 splénocytes / puits (milieu RPMI + 10% SVF + 2mM glutamine) dans une plaque ELISpot (Millipore) pré-traitée par des anticorps anti-IFN γ murin. On ajoute 5 μ g/ml de peptide *SIINFEKL* par puits pour la restimulation des LT CD8+ et on incube pendant 16-18h. L'ajout du peptide dans le milieu va activer les lymphocytes T CD8+ spécifique du peptide *SIINFEKL* et induire la sécrétion d'IFN γ , qui se fixe aux anticorps. Le complexe est ensuite révélé par un anticorps biotinylé, puis par la streptavidine liée à une enzyme hydrolysant un substrat chromogène insoluble. La précipitation localisée de ce substrat génère des tâches colorées ou « immunospots » qui sont comptées par un automate (Bioreader 4000 Pro) (figure 16). On analyse finalement le nombre de spots obtenus pour 4.10^5 splénocytes.

1. Préparation des doses vaccinales

Groupe	Mutant	Nombre de souris	Dose injectée (bactéries)
1	<i>CHA-OSTΔuvrA pEAI3S54-PADRE-OVA</i>	3	5.10^6
2	<i>CHA-OSTΔuvrA pEAI3S54-PADRE-OVA</i> tuées par la chaleur	3	5.10^6
3	<i>CHA-OST KBMA pEAI3S54-PADRE-OVA</i>	3	5.10^6

Tableau 7 : Répartition des souris pour le premier test ELISpot : les groupes 1 (dose vaccinale définie par Epaulard (63)) et 2 correspondent à des contrôles. Le groupe 3 reçoit les bactéries traitées par PCT : 5 μ M d'amotosalène ; 7,2J/cm²

Groupe	Mutant	Nombre de souris	Dose injectée (bactéries)
1	<i>CHA-OST KBMA pEAI3S54-PADRE-OVA</i>	3	5.10^7
2	<i>CHA-OSTΔuvrA pEAI3S54-PADRE-OVA</i> résiduelles après PCT/ 5.10^7	3	10^2
3	<i>CHA-OST KBMA pEAI3S54-PADRE-OVA</i>	3	2.10^8
4	<i>CHA OSTΔuvrA pEAI3S54-PADRE-OVA</i> résiduelles après PCT/ 2.10^8	3	4.10^2

Tableau 8 : Répartition des souris pour le second test ELISpot : les groupes 1 et 3 reçoivent les bactéries traitées par PCT. Les groupes 2 et 4 correspondent respectivement au nombre de bactéries vivantes résiduelles après un PCT sur 5.10^7 et 2.10^8 bactéries. PCT : 5 μ M d'amotosalène ; 7,2J/cm²

- Souche CHA-OST Δ uvrA pEAI3S54-PADRE-OVA : après une culture O/N dans milieu LB-Cb, les bactéries sont centrifugées puis reprises dans du LB-Cb contenant 0,5mM IPTG à une $DO_{600nm} = 0,2$. A $DO_{600nm} = 1$, on centrifuge 1 ml de culture (10000g, 3min) puis on lave 2 fois avec du tampon PBS stérile. Enfin le culot bactérien est repris dans 1 ml de PBS stérile et différentes dilutions sont réalisées pour obtenir le nombre de bactéries désiré (10^2 , 4.10^2 ou 5.10^6) dans 100 μ L de PBS stérile.

- Souche CHA-OST Δ uvrA pEAI3S54-PADRE-OVA tuée par la chaleur (*Heat-Killed, HK*) : les mêmes bactéries concentrées à 5.10^6 bactéries/100 μ L de PBS sont soumises à une température de 100°C pendant 20 minutes.

- Souche CHA-OST **KBMA** pEAI3S54-PADRE-OVA : après une culture O/N dans LB-Cb, les bactéries sont centrifugées puis reprises dans du LB-Cb contenant 0,5mM IPTG à une DO_{600nm} de 0,2. A une $DO_{600nm} = 0,5$, une concentration de 5 μ M d'amotosalène est ajoutée directement au milieu de culture puis la souche est à nouveau mise en culture. A une DO_{600nm} de 1 on expose les bactéries aux UVA à une énergie de 7,2 joules/cm² puis on centrifuge (10000g, 3min) et on lave 2 fois les bactéries (1ml) avec du tampon PBS stérile. Enfin le culot bactérien est repris dans 1 ml de PBS stérile et différentes dilutions sont réalisées pour obtenir le nombre de bactéries souhaité (5.10^6 , 5.10^7 , 2.10^8) dans 100 μ L de PBS.

2. Manipulation des souris

Les souris sont anesthésiées par isoflurane quelques secondes avant injection.

Une observation quotidienne des souris est effectuée durant 15 jours à partir de la première injection afin de suivre leur état clinique. Ces souris sont certifiées indemnes de pathogènes spécifiques et alimentées en eau et nourriture au sein de la Plate-forme de Haute Technologie Animale (PHTA) de la Faculté de Médecine/Pharmacie de Grenoble. Elles sont maintenues en isolateur puis manipulées sous hotte à flux laminaire pour diminuer les contacts avec l'extérieur. Les expériences réalisées sont approuvées par le comité pour l'expérimentation animale de l'Université Joseph Fourier.

RESULTATS

A. Le traitement photochimique bloque la réplication du mutant

CHA-OST Δ uvrA

L'élaboration du nouveau vecteur CHA-OST KBMA a consisté dans un premier temps à réaliser l'inactivation du système nécessaire à la réparation des lésions de l'ADN (système NER), par délétion du gène *uvrA* codant une sous-unité de l'exonuclease ABC. Nous avons fait le choix, dans un premier temps, d'inactiver uniquement le gène *uvrA*. Une fois cette souche CHA-OST Δ uvrA obtenue, le traitement photochimique a été optimisé pour inhiber la réplication de la souche. Nous avons entrepris par la suite de développer un mutant Δ uvrAB.

1. Elaboration des mutants CHA-OST Δ uvrA et Δ uvrAB

Dans un premier temps, seule la délétion Δ uvrA est effectuée. La mutation Δ uvrB sera réalisée ultérieurement sur le mutant CHA-OST Δ uvrA, afin de tester si cette délétion supplémentaire modifie l'efficacité du traitement photochimique.

Les différentes étapes de production du mutant CHA-OST Δ uvrA ont été validées par PCR sur ADN génomique, à l'aide d'amorces contrôles situées de part et d'autre du gène *uvrA* (tableau 5)(figure 17) :

1. Amplification d'un fragment de 3936pb pour la souche sauvage (WT) CHA-OST
2. Mutant CHA-OST Δ uvrA non curé de la cassette de résistance à la gentamicine (Gm^R), caractérisé par une amplification de 2257pb
3. Mutant final CHA-OST Δ uvrA curé de la cassette de résistance à la gentamicine (Gm^S), défini par un fragment de 1455pb

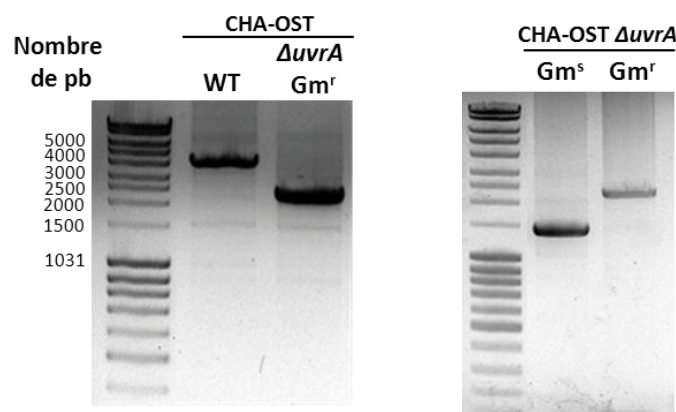


Figure 17 : Analyse génotypique du mutant CHA-OST Δ uvrA en comparaison avec la souche sauvage. PCR de vérification sur ADN génomique puis migration du produit de PCR sur gel d'agarose. WT : wild-type

Nous avons contrôlé que la mutation $\Delta uvrA$ n'affectait pas la cinétique de croissance des bactéries en milieu liquide ainsi que le phénotype des colonies en milieu solide (résultats non illustrés).

2. Mise au point du traitement photochimique

La sensibilité du mutant au PCT a été déterminée en faisant varier à la fois l'énergie d'exposition aux UVA et la concentration d'amotosalène dans le milieu de culture. Ce traitement ayant déjà été optimisé pour la bactérie Gram-négatif *Salmonella typhimurium* $\Delta uvrAB$, nous avons exposé les souches de *P. aeruginosa* CHA-OST et CHA-OST $\Delta uvrA$ de manière similaire (78).

La réponse au PCT est évaluée par comptage des CFU/ml résiduelles après dépôt sur milieu PIA (spécifique à *Pseudomonas*) et culture O/N à 37°C. Les bactéries non traitées sont conservées à température ambiante le temps du traitement puis étalées de la même manière sur milieu PIA. Des dilutions sont effectuées avant dépôt en tenant compte des résultats obtenus lors des premiers essais de PCT, de manière à compter facilement les colonies résiduelles.

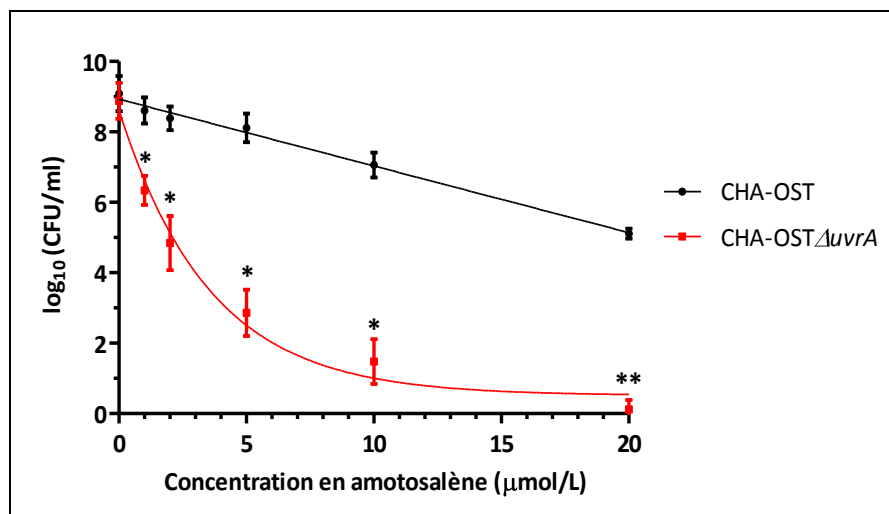


Figure 18 : Viabilité des bactéries après PCT en fonction de la concentration d'amotosalène pour les souches CHA-OST et CHA-OST $\Delta uvrA$. Exposition aux UVA=7,2 J/cm². Expérience réalisée 5 fois en duplicat. Différence significative entre les 2 souches : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Les barres d'erreur correspondent à la déviation standard (SD).

On observe une corrélation nette entre l'inactivation de la réplication bactérienne et la concentration d'amotosalène utilisée pour le PCT. La dose la plus faible pour obtenir une inactivation complète de la réplication est évaluée à 20µM pour le mutant CHA-OST Δ uvrA (figure 18), associée à une exposition aux UVA de 7,2 J/cm². A cette concentration la souche mutante est 5 log₁₀ plus sensible au PCT que la souche parentale (\approx 1 CFU/ml de bactéries vivantes résiduelles versus $1,4 \cdot 10^5$ CFU/ml \pm $1,4 \cdot 10^4$ respectivement, $p < 0,01$), démontrant l'efficacité du PCT sur le mutant Δ uvrA, et confirmant l'inactivation de l'exonuclease ABC. Une concentration supérieure d'amotosalène ne paraît pas avoir d'impact sur la souche sauvage (données non illustrées). Ce constat souligne l'importance du système de réparation NER et de l'activité de l'exonuclease ABC lors de lésions induites par les UV sur l'ADN.

Une augmentation de l'exposition aux UVA pour une dose d'amotosalène fixe de 2µM paraît affecter l'efficacité du traitement sur la souche CHA-OST Δ uvrA (figure 19). Néanmoins, le bénéfice d'un PCT avec une exposition de 13 J/cm² plutôt que 7,2 J/cm² paraît moindre par rapport au risque d'accroissement de lésions UV-induites et de pontages d'amotosalène dans l'ADN. Il faut en effet bien garder en mémoire que l'optimisation du PCT consiste en l'inactivation de la réplication bactérienne tout en conservant un maximum d'expression du génome ; il faut donc veiller à limiter les pontages réalisés dans l'ADN.

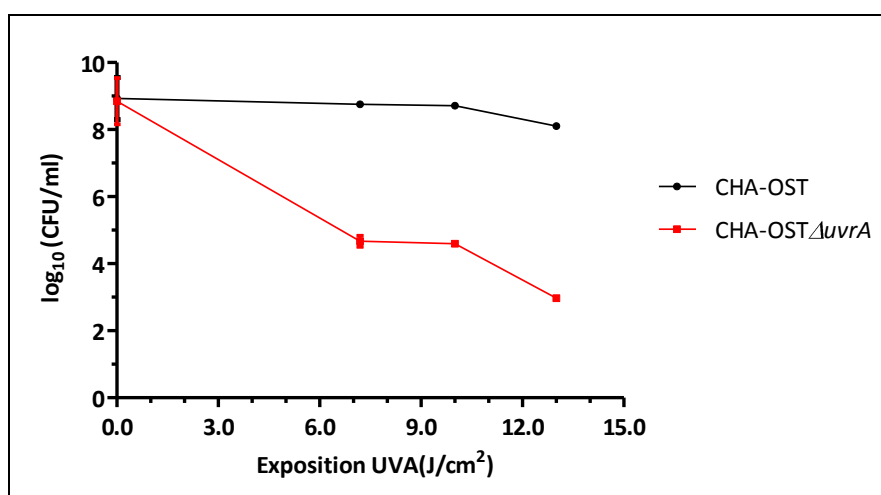


Figure 19 : Viabilité des bactéries après PCT en fonction de l'énergie d'exposition aux UVA pour les souches CHA-OST et CHA-OST Δ uvrA. Concentration d'amotosalène=2µM. Expérience réalisée une fois en duplicat.

Nous avons été surpris par la concentration importante d'amotosalène (20µM) nécessaire pour inactiver complètement le mutant CHA-OST Δ uvrA, pour une exposition de 7,2J/cm², en

regard des travaux effectués sur les souches *Salmonella typhimurium* $\Delta uvrAB$ et *Listeria monocytogenes* $\Delta uvrAB$ (inactivation de la réplication à 1,5 μ M et 200nM d'amotosalène respectivement, pour une même exposition aux UVA). Ces résultats seront discutés ultérieurement.

Pour la poursuite des investigations, il a été décidé d'évaluer l'impact de plusieurs concentrations d'amotosalène sur l'activité métabolique de la souche CHA-OST $\Delta uvrA$, en fixant l'énergie à 7,2 J/cm². Nous tiendrons compte systématiquement du nombre de bactéries vivantes résiduelles après traitement PCT, en fonction de la concentration d'amotosalène utilisée, pour ne pas apporter de biais dans les résultats.

L'objectif suivant est de définir un PCT standard optimal conférant à la souche les propriétés attendues d'un « KBMA ».

B. Le système de sécrétion de type III de CHA-OST $\Delta uvrA$ reste fonctionnel après traitement photochimique

L'effet du PCT sur la souche CHA-OST $\Delta uvrA$ transformée par le plasmide pEAI3S54-PADRE-OVA est similaire à celui sur la souche CHA-OST $\Delta uvrA$ (données non illustrées).

Dans un souci de simplification, nous avons baptisé « CHA-OST KBMA » la souche mutante CHA-OST $\Delta uvrA$ ayant subi un PCT.

1. Sécrétion de l'antigène vaccinal S54-PADRE-OVA par le SSTT

La néosynthèse de la protéine S54-PADRE-OVA par la souche CHA-OST $\Delta uvrA$ pEAI3S54-PADRE-OVA, ainsi que la formation du SSTT, sont activées en présence d'IPTG dans le milieu de culture. Après PCT, l'ajout d'EGTA induit une déplétion calcique qui « ouvre » le SSTT et entraîne la sécrétion de la protéine dans le surnageant de culture. La déplétion calcique favorise aussi la libération d'ExsA qui stimule la synthèse de l'antigène (*cf.* Matériels et Méthodes).

Un premier test de sécrétion a été réalisé afin de contrôler la capacité de sécrétion de la souche mutante $\Delta uvrA$. Comme le montre la figure 20, la délétion du gène *uvrA* ne semble pas affecter la sécrétion de l'antigène S54-PADRE-OVA par le SSTT et des protéines PopB et

PopD, qui sont également sécrétées dans le surnageant de culture lors de la déplétion calcique.

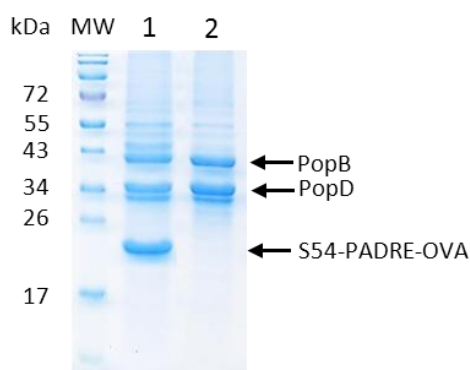


Figure 20: Profil de sécrétion de la souche *CHA-OST Δ uvrA* pEAI3S54-PADRE-OVA. Analyse des surnageants de culture par SDS-PAGE. 1. *CHA-OST Δ uvrA* pEAI3S54-PADRE-OVA. 2. *CHA-OST Δ uvrA*, contrôle négatif. PopB et PopD sont sécrétées dans le milieu, de la même manière que les protéines couplées à ExoS54, lors de l'activation artificielle du SSTT par déplétion calcique.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la capacité de sécrétion de la souche *CHA-OST KBMA* pEAI3S54-PADRE-OVA après exposition à différents PCT (figure 21). Nous avons analysé en parallèle la sécrétion correspondant au nombre de bactéries vivantes résiduelles estimées après chaque type de PCT. Pour une concentration d'amotosalène à 1, 2, 5 et 10 μ M, on retrouve respectivement 5.10^6 , 10^5 , 10^3 et 10 bactéries vivantes par millilitre de milieu de culture (figure 18).

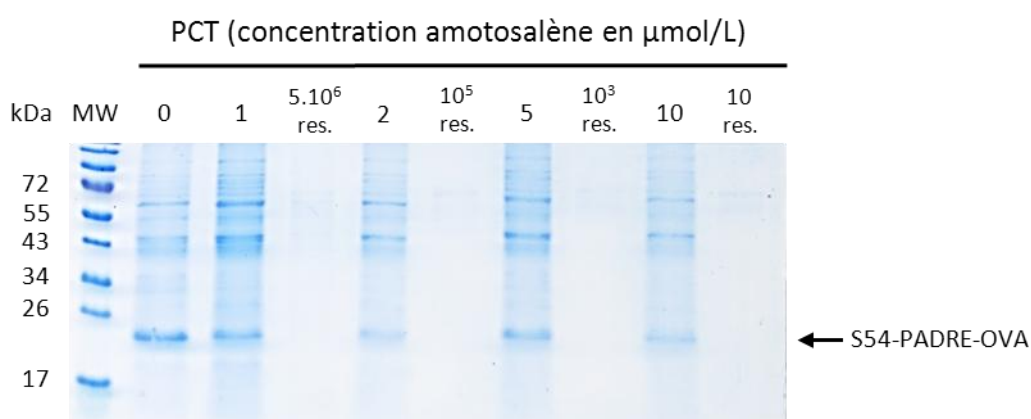


Figure 21: Profil de sécrétion de la souche *CHA-OST KBMA* pEAI3S54-PADRE-OVA à différents PCT. Analyse par SDS-PAGE des surnageants de culture. La sécrétion de S54-PADRE-OVA par les bactéries résiduelles vivantes (res.) (selon figure 18), en fonction du type de PCT reçu, est analysée en parallèle. PCT 0 μ M d'amotosalène : totalité des bactéries vivantes ; PCT 1 μ M : 5.10^6 bactéries vivantes résiduelles, PCT 2 μ M : 10^5 ; PCT 5 μ M : 10^3 ; PCT 10 μ M : 10. Expérience réalisée 2 fois.

Le SSTT semble être toujours fonctionnel suite au PCT. En effet, on observe clairement la sécrétion de la protéine S54-PADRE-OVA pour les différents traitements, bien qu'une diminution de sécrétion dépendante de la concentration d'amotosalène soit observée (figure 21). Nous avons remarqué à deux reprises que la sécrétion des protéines PopB et PopD était affectée par le PCT (il est difficile de les voir sur le gel de protéines), même en absence d'amotosalène.

La sécrétion de l'antigène post-PCT n'est pas liée aux bactéries résiduelles vivantes, dont la sécrétion de la protéine S54-PADRE-OVA n'est pas détectable en coloration par bleu de Coomassie.

Toutefois, il faut s'assurer que la protéine retrouvée dans le surnageant de culture n'est pas issue d'une lyse bactérienne accrue suite au PCT, qui entraînerait un relargage de la protéine dans le surnageant et fausserait ainsi l'analyse des résultats.

Afin de lever ce doute, un nouveau test de sécrétion est effectué pour chaque PCT mais dans 2 conditions différentes : en présence ou en absence d'EGTA (figure 22). La déplétion calcique induite par l'EGTA permettant l'activation de la sécrétion par le SSTT, l'antigène S54-PADRE-OVA sera présent dans le surnageant. Par contre, en absence d'EGTA la protéine s'accumule dans le cytoplasme de la bactérie (en présence d'IPTG) mais n'est pas retrouvée dans le surnageant, excepté dans le cas d'une lyse bactérienne.

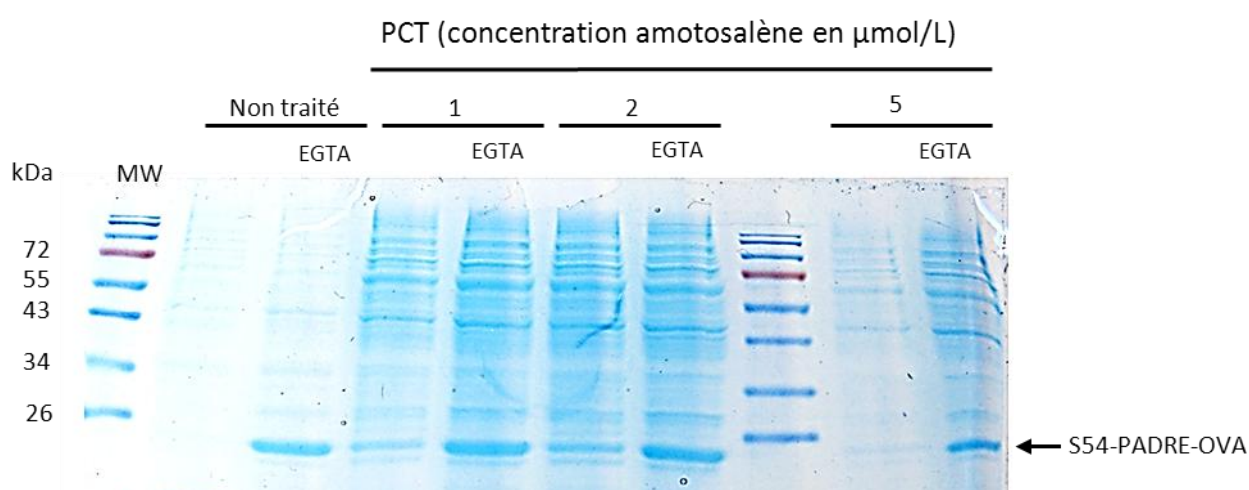


Figure 22 : Analyse des surnageants de culture de la souche *CHA-OSTΔuvrA* pEAI54-PADRE-OVA avec ou sans activation de la sécrétion, à différents PCT. Analyse par SDS-PAGE en présence d'IPTG (activation de la production de l'antigène) et en présence (sécrétion activée) ou en absence (pas de sécrétion) d'une déplétion calcique induite par EGTA.

Les résultats obtenus suggèrent que la présence de la protéine S54-PADRE-OVA dans le surnageant de culture est bien issue de la sécrétion via le SSTT (figure 22). Cependant, la quantité non négligeable de protéines observée dans les surnageants de bactéries traitées, mais sans activation de la sécrétion, laisse à penser que le traitement pourrait favoriser la lyse des bactéries.

Cette expérience n'a pas été réalisée avec un PCT à 10 μ M d'amotosalène.

C. Le vecteur CHA-OST KBMA est moins toxique pour les cellules

1. Cytotoxicité de la souche CHA-OST KBMA PEAI3S54-PADRE-OVA vis-à-vis des macrophages J774 :

Les résultats de viabilité cellulaire de macrophages J774 mis en contact avec la souche CHA-OST KBMA PEAI3S54-PADRE-OVA (figure 23) montrent une cytotoxicité faible (20-30%) à 3 heures pour les différents PCT. En comparaison la cytotoxicité de la souche témoin non traitée par PCT (CHA-OST Δ uvrA PEAI3S54-PADRE-OVA) est proche de 100%.

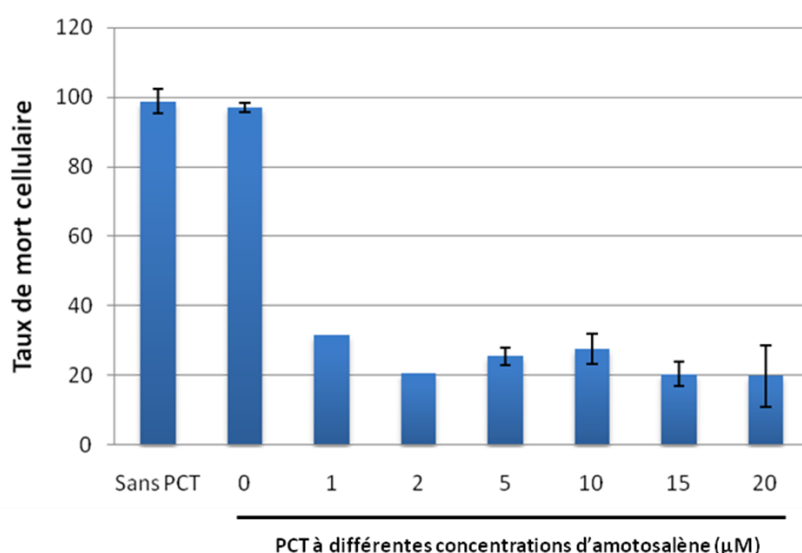


Figure 23 : Mortalité des macrophages J774 après 3h de contact avec la souche CHA-OST Δ uvrA pEAI3S54-PADRE-OVA (MOI 5:1) traitée ou non par PCT. L'expérience a été réalisée 1 fois en triplicat. Les barres d'erreur correspondent à la déviation standard.

Les résultats de cytotoxicité obtenus par Epaulard et Toussaint (62) avaient montré que la souche CHA-OST provoquait une mort cellulaire précoce (à 3 heures) de l'ordre de 50 %. Il faut préciser que la méthode utilisée n'était pas la même (marquage à l'iodure de propidium et analyse par cytométrie en flux) et que les cellules employées alors n'étaient pas des macrophages J774 mais des cellules dendritiques myéloïdes murines (BMDC).

D'après ces résultats, le mutant CHA-OST KBMA remplit une condition essentielle pour être utilisé comme vecteur pour délivrer l'antigène aux cellules dendritiques : sa toxicité est réduite en comparaison à la souche sauvage et ce, dès l'ajout d'une faible concentration d'amotosalène. Cependant cette baisse importante de toxicité suggère une diminution critique de l'efficacité du vecteur, et notamment de sa capacité à activer les cellules dendritiques. Il faut donc maintenant s'assurer que cette souche KBMA est bien capable de stimuler la réponse immune et de générer une réaction lymphocytaire T CD8+ spécifique de l'antigène.

D. CHA-OST KBMA active les cellules dendritiques murines et stimule une réponse T CD8+ spécifique *in vitro*

Le vecteur a pour but de délivrer une protéine antigénique dans le compartiment intracellulaire des CPAg (dont les CD) afin que celles-ci présentent des peptides issus de cet antigène associés aux molécules de CMH I. La présentation par les BMDC murines a été étudiée à l'aide de l'hybridome murin B3Z (clone T CD8+) capable de reconnaître, via son TCR, l'association peptide *SIINFEKL*-CMHI H2K^b.

Nous avons utilisé la souche CHA-OST Δ uvrA pEAI3S54-PADRE-OVA non traité par PCT comme contrôle positif pour ce test (correspondant à 100% d'activation des BMDC) (Figure 24).

Ces résultats montrent que le mutant CHA-OST KBMA pEAI3S54-PADRE-OVA est capable d'activer les cellules dendritiques et de les charger en antigène de manière à ce qu'elles présentent le peptide *SIINFEKL*, par le CMH I, à l'hybridome B3Z. Une activation des hybridomes B3Z de 80 et 60 % est observée respectivement avec des PCT à 2 et 5 μ M d'amotosalène. Il ne s'agit pas d'une activation liée aux bactéries résiduelles vivantes post-PCT pour lesquelles l'activation est inférieure à 20%. Pour un PCT à 1 μ M, seulement 25%

d'activation est obtenu ce qui semble être un résultat aberrant ; d'autant plus que l'activation correspondant aux bactéries résiduelles vivantes après PCT à 1 μ M d'amotosalène est de 50%.

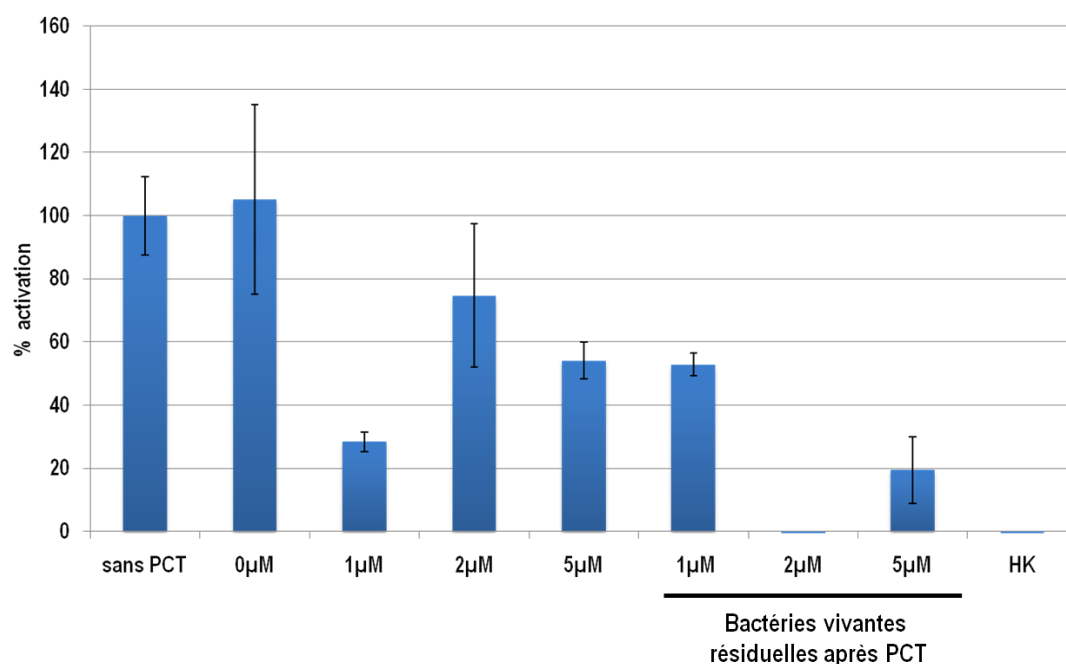


Figure 24 : Présentation par le CMH I d'un peptide issu de l'ovalbumine par les BMDC ayant interagi avec la souche CHA-OST KBMA PEAI3S54-PADRE-OVA exposée à différents PCT (différentes concentrations d'amotosalène). Les barres d'erreur correspondent à la déviation standard (SD). Le graphe représente les résultats d'une seule expérience en triplicat. HK : *heat-killed*

Enfin l'absence d'activation observée avec les bactéries tuées par la chaleur (HK) montre que la délivrance intracytoplasmique de l'antigène S54-PADRE-OVA par le SSTT est bien une étape nécessaire à la présentation par les BMDC. Ce contrôle permet de s'assurer que l'antigène produit par la bactérie n'est pas délivré suite à une captation dans le milieu par les BMDC ou par une phagocytose du vecteur, suivi d'un apprêtement par cross-présentation au niveau du CMH I. D'autres contrôles effectués par Epaulard et Toussaint avaient permis de démontrer que l'activation du clone B3Z était bien antigène-spécifique (pas d'activation avec une souche CHA-OST PEAI554-GFP), et lié à l'injection par le SSTT (pas d'activation avec une souche CHA-OST PEAI50-OVA n'exprimant pas la séquence S54 nécessaire à la sécrétion de l'antigène par le SSTT)(63).

Ce test n'a pu être réalisé qu'une seule fois faute de temps et de matériel (livraison « aléatoire » des cellules dendritiques) et le PCT à 10 μ M d'amotosalène n'a pas pu être testé. Globalement, bien que ces résultats demandent à être confirmés, ces données témoignent d'une présentation efficace par les molécules du CMH I du peptide *SIINFEKL* de

l'ovalbumine ; d'autant plus qu'un signal positif ne peut pas être artéfactuel dans le cadre de ce test. La vectorisation de l'antigène ainsi que l'activation des cellules dendritiques par cette nouvelle souche paraît donc être efficace et confirme la fonctionnalité du SSTT suite au PCT.

E. CHA-OST KBMA est moins toxique *in vivo* en modèle murin

Un travail important a été effectué au laboratoire pour diminuer la toxicité inhérente à la souche de *P. aeruginosa* utilisée. La délétion des gènes codant les exotoxines ExoS et ExoT a permis de diminuer d'environ 20% la toxicité de la bactérie. Ensuite un travail d'optimisation a été conduit afin de rendre la souche auxotrophe pour les acides aminés aromatiques (71), stratégie qui a été validée plusieurs fois pour atténuer la toxicité d'autres germes comme *Salmonella typhimurium*.

La tolérance d'une souche « KBMA » devrait normalement être supérieure aux différents vecteurs testés précédemment en raison de son incapacité à se répliquer.

Notre choix s'est porté sur un PCT à 5µM d'amotosalène pour la préparation de la souche CHA-OST KBMA PEAI3S54-PADRE-OVA, en raison du faible nombre de bactéries résiduelles vivantes obtenues (1000 pour 5.10^8 bactéries initiales) et en conservant une sécrétion importante par le SSTT. Le peu de données recueillies avec un PCT à 10µM (notamment en termes d'activation des CD) ne nous permettait pas pour le moment d'envisager la suite des tests avec un tel traitement.

Les souris (n=3 par groupe) ont reçu par voie sous-cutanée (flanc droit) 5.10^6 , 5.10^7 ou 5.10^8 bactéries CHA-OST KBMA PEAI3S54-PADRE-OVA après PCT à 5µM.

1 souris sur 3 était morte à 48 heures après injection dans le groupe ayant reçu 5.10^8 bactéries KBMA. Les 2 autres souris ont développé un abcès important au point d'injection et ont été euthanasiées à 72 heures. Aucune souris des 2 autres groupes n'est morte mais nous avons noté la présence de petits abcès au point d'injection pour le groupe ayant reçu 5.10^7 bactéries KBMA. Notons que ces abcès avaient disparu 5 jours après l'injection.

Ce nouveau mutant semble donc avoir une toxicité au moins 10 fois inférieure par rapport à la souche CHA-OST, initialement utilisée pour la preuve de concept, dont la dose maximum

injectable était fixée à 5.10^6 bactéries. Une seconde étude de toxicité est envisagée afin de préciser avec exactitude la dose maximale injectable.

F. La vaccination avec le vecteur CHA-OST KBMA induit une immunité cellulaire spécifique T CD8+ anti-OVA *in vivo* en modèle murin

Nous avons cherché à déterminer si la vectorisation de l'antigène S54-PADRE-OVA par le vecteur CHA-OST KBMA pEAI3S54-PADRE-OVA était associée à une réaction lymphocytaire T CD8+ dirigée contre cet antigène *in vivo*. Les souris ont reçu différentes injections à 2 reprises à 7 jours d'intervalle selon le schéma vaccinal prophylactique mis au point au laboratoire (J-14, J-7), puis la rate a été prélevée à J0 après euthanasie des souris. Un test ELISpot a été effectué à partir des splénocytes stimulés par le peptide épitope *SIINFEKL*. Les résultats obtenus en nombre de spots (correspondant aux nombre de LT CD8+ cytotoxiques spécifiques) pour 4.10^5 splénocytes sont comparés à ceux de la souche non traitée.

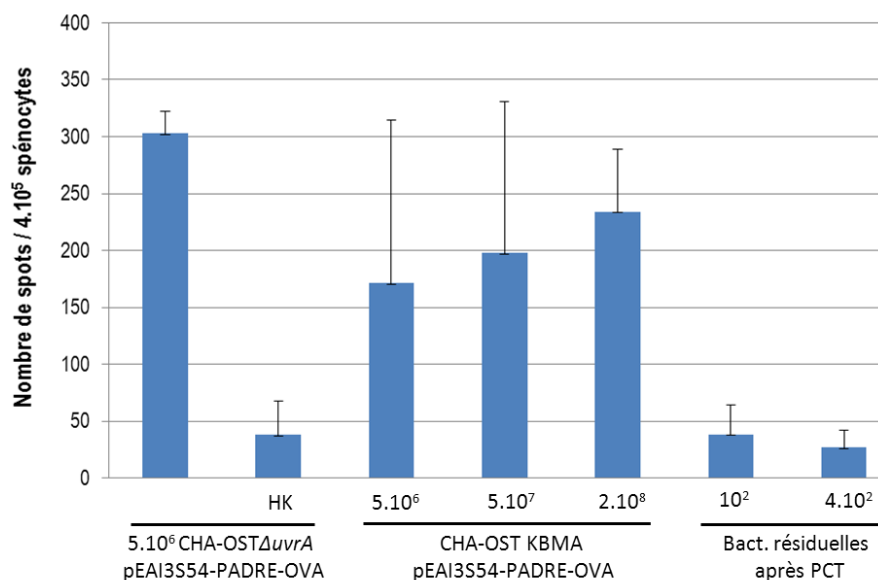


Figure 25 : Quantification par ELISpot de la réponse spécifique T CD8+ cytotoxique induite par différentes conditions de vaccination. Les souris (n=3 par groupe) ont été injectées dans le flanc droit à 2 reprises (J-14 et J-7) et les rates ont été prélevées à J0 pour extraction des splénocytes.. Après PCT à $5\mu\text{M}$ d'amotosalène de 5.10^6 , 5.10^7 ou 2.10^8 bactéries CHA-OST Δ uvrA pEAI3S54-PADRE-OVA, on retrouve respectivement 10 , 10^2 et 4.10^2 bactéries vivantes résiduelles. Les barres d'erreur correspondent à la déviation standard (SD). Les résultats représentent la moyenne de deux expériences indépendantes. HK : *Heat-killed*

Une fréquence plus élevée de lymphocytes T CD8+ sécrétant de l'IFN γ est obtenue lorsque les souris ont été injectées par une souche capable d'injecter l'antigène S54-PADRE-OVA par le SSTT. Ces résultats montrent que l'administration du vecteur CHA-OST KBMA pEAI3S54-PADRE-OVA est bien associée à une élévation de la proportion de T CD8+ spécifiques du peptide SIINFELK (figure 25). Il ne s'agit pas d'une réponse immune engendrée par l'injection des bactéries vivantes résiduelles, comme on peut le voir dans les contrôles, mais réellement d'une activation de l'immunité par les bactéries KBMA. Néanmoins nous avons observé des réponses très hétérogènes au sein des groupes ayant reçu 5.10^6 ou 5.10^7 bactéries KBMA. En effet pour ces 2 groupes seulement 1 souris sur 3 a très bien répondu au traitement alors que pour le groupe à 5.10^6 bactéries non traitées par PCT on observe des réponses similaires pour les 3 animaux.

Pour le groupe ayant reçu 2.10^8 bactéries KBMA, 2 souris sur 3 ont très bien répondu à la vaccination et une réponse d'intensité équivalente à celle de la souche non traitée est obtenue. Nous avons pour projet d'effectuer des expériences complémentaires avec plus de souris afin d'obtenir des données plus robustes.

DISCUSSION

A. Généralités

Ce travail a été conçu à partir des données suivantes, ayant établi l'intérêt de l'utilisation et de l'asservissement du SSTT de *P. aeruginosa* en immunothérapie antitumorale (63,71,73) :

- la translocation intracytoplasmique *in vivo* d'un antigène d'intérêt par le SSTT induit la présentation par le CMH I de peptides épitopes issus de l'antigène vectorisé
- la présentation par le CMH I oriente la réponse immune vers une réaction lymphocytaire T CD8+ cytotoxique, réponse particulièrement recherchée pour le développement d'une immunothérapie antitumorale efficace.

Les souches vectrices atténuées de *P. aeruginosa* ont déjà montré une toxicité réduite et des résultats prometteurs *in vitro* et *in vivo*, laissant à penser que cette stratégie de vaccination thérapeutique pouvait avoir un réel potentiel. Cependant le risque de dissémination de la souche et sa persistance dans l'organisme après injection sont des points critiques pour un développement clinique futur.

Le laboratoire cherche donc à mettre au point une souche mutante non répliquative, peu toxique, et dont l'efficacité est conservée. Il faut néanmoins veiller à ne pas trop atténuer la virulence de la souche, au risque d'une élimination rapide du vecteur par le système immunitaire, alors incapable d'interagir avec les cellules cibles.

Afin de résoudre cette problématique, nous nous sommes inspirés d'une stratégie mise au point par Brockstedt *et al.* en 2005 (76,77) pour développer un vecteur bactérien d'immunothérapie efficace, dépourvu de toxicité envers l'hôte et sans risque de dissémination dans l'environnement. Ce concept de vaccin « *Killed But Metabolically Active* » a été validé sur les souches *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*, déjà utilisées antérieurement comme vecteurs d'antigènes pour l'immunothérapie. Le procédé consiste à exposer les bactéries, dont le système de réparation des lésions de l'ADN a été inactivé, à un traitement photochimique permettant d'abolir leur répllication tout en conservant leur activité métabolique. **On obtient ainsi l'innocuité d'un vaccin inactivé couplée à l'efficacité d'un vaccin vivant atténué.**

Les résultats obtenus par ces différentes équipes nous ont encouragés à développer une souche vectrice *P. aeruginosa* KBMA répondant aux attentes du laboratoire.

B. Mise au point du traitement photochimique

Nous avons donc dans un premier temps produit le mutant CHA-OST $\Delta uvrA$ afin d'inactiver la sous-unité A de l'exonucléase ABC qui contribue à la réparation des lésions induites par les UV sur l'ADN. Théoriquement la perte d'une seule de ces sous-unités suffit à inactiver l'enzyme (86) et rend alors la bactérie particulièrement sensible aux lésions induites par les rayonnements UV associés aux pontages par l'amotosalène. Nous avons donc estimé que cette seule délétion suffirait à produire le mutant CHA-OST KBMA. L'application d'un traitement photochimique sur le mutant $\Delta uvrA$ en comparaison avec la souche parentale a confirmé cette hypothèse. Pour une concentration de 20 μ M d'amotosalène et une exposition aux UVA de 7,2J/cm², on observe une inactivation totale de la réplication pour le mutant CHA-OST $\Delta uvrA$ alors qu'on retrouve 10⁵ bactéries vivantes résiduelles pour la souche parentale CHA-OST. Toutefois, les concentrations d'amotosalène utilisées pour obtenir un PCT efficace sur ce mutant sont 10 à 100 fois plus élevées que dans la littérature (77,78). Deux hypothèses pourraient expliquer cette différence entre les concentrations utilisées pour *Listeria* $\Delta uvrAB$ (200nM) ou *Salmonella* $\Delta uvrAB$ (1,5 μ M) et le mutant *Pseudomonas* $\Delta uvrA$:

1. Seule la mutation $\Delta uvrA$ a été effectuée contrairement aux travaux qui ont été faits sur des bactéries $\Delta uvrAB$. Une revue de la littérature nous a permis de découvrir que l'exonucléase ABC conservait une faible activité même en l'absence de la sous-unité A que nous avons inactivée (87). La production du double mutant $\Delta uvrAB$ a donc été réalisée par la suite à partir du mutant CHA-OST $\Delta uvrA$ pour augmenter l'efficacité du PCT.

2. *P. aeruginosa* est une bactérie présente naturellement dans l'environnement. Cette espèce est donc exposée aux rayonnements UV sans que sa réplication n'en soit altérée. Plusieurs systèmes de réparation de l'ADN ainsi qu'une protection accrue aux UV contribuent probablement à une moindre efficacité du PCT. Cette hypothèse est à corrélérer aux données obtenues par Cerus Corporation sur l'étendue de l'inactivation de *P. aeruginosa* par INTERCEPT Blood System® (tableau 4). *P. aeruginosa* est moins sensible au PCT (réduction de 4,5 log₁₀) par rapport à *Salmonella enterica* sérotype *choleraesuis* ou *Listeria monocytogenes* (réduction > 6.2 log₁₀), bactéries peu présentes dans l'environnement. Il pourrait donc être nécessaire d'appliquer un PCT plus robuste aux mutants *P. aeruginosa*

$\Delta uvrA$ pour obtenir le même effet que sur d'autres bactéries. Peut être qu'il serait aussi intéressant de chercher des mutants (autres délétions de gènes) plus sensibles aux rayonnements UV.

Il faudra par ailleurs réfléchir à la production d'un lot homogène de souche vectrice KBMA afin d'effectuer les tests *in vitro* et *in vivo* avec des bactéries traitées de la même manière. Brockstedt *et al.* avaient produit un lot de *Listeria* KBMA, qu'ils avaient aliquoté et congelé à -80°C. Ce même produit avait été utilisé pour toutes les expériences, supprimant ainsi le biais de la variabilité du traitement photochimique des souches mutées.

C. Fonctionnalité du système de sécrétion de type III après PCT

Différentes concentrations d'amotosalène ont été testées pour les expériences *in vitro* afin de comparer l'activité métabolique de souches exposées à des PCT différents. Finalement, afin de conserver un maximum d'activité métabolique, nous avons choisi de traiter la souche CHA-OST $\Delta uvrA$ avec une concentration d'amotosalène de 5 μ M associée à une exposition aux UVA de 7,2J/cm². Ce PCT inactive plus de 99% des bactéries du milieu et conserve seulement 1000 bactéries vivantes résiduelles sur 500 millions de bactéries initiales. L'objectif du PCT, dans notre cas, est d'inactiver les souches tout en gardant une activité transcriptionnelle et traductionnelle ; nous devons donc chercher à minimiser la fréquence des pontages d'amotosalène sur l'ADN pour conserver l'expression du génome de la bactérie.

Cette souche KBMA est toujours capable de sécréter un antigène par le SSTT. Nous avons observé que la sécrétion diminuait avec l'augmentation des concentrations d'amotosalène utilisées pour le PCT, ce qui conforte notre choix d'une concentration inférieure à la concentration nécessaire pour inactiver l'intégralité des bactéries.

Il serait intéressant à l'avenir de définir le caractère durable ou non de l'activité métabolique des souches KBMA ainsi que le degré de cette activité. En effet, si ce produit doit être un jour utilisé en clinique, il faudra déterminer sa stabilité et son efficacité après un stockage plus ou moins long.

D. Toxicité du vecteur CHA-OST KBMA

Nous avons constaté que la cytotoxicité de la souche KBMA *in vitro* sur une lignée de macrophages J774 était nettement diminuée par rapport à la souche parentale, et ce, dès l'exposition à un PCT à faible concentration d'amotosalène.

La cytotoxicité de la souche CHA-OST est principalement médiée par le SSTT qui crée des pores au niveau de la membrane cellulaire et favorise la lyse de la cellule, tout en injectant la protéine dans le cytoplasme (65). Ainsi, une baisse de cytotoxicité de la souche vis-à-vis des macrophages pourrait correspondre à une perte de fonctionnalité du système de sécrétion de type III. Cette observation pourrait s'expliquer par la diminution dans le surnageant des protéines PopB et PopD, observée lors des tests de sécrétion *in vitro*, qui interviennent dans la formation des pores au niveau de la membrane cellulaire.

On pourrait donc s'attendre à observer une diminution critique de l'efficacité de la souche KBMA comme vecteur d'antigène.

Une nette augmentation de la tolérance de la souche KBMA *in vivo* sur la souris a été observée par rapport à la souche parentale. Les études précédentes retrouvaient une toxicité importante de la souche CHA-OST dès l'injection de 10^7 bactéries (4/6 souris mortes à 48h). Nous avons démontré que la souche KBMA pouvait être injectée à des doses supérieures à 5.10^7 bactéries. Cependant, la présence d'un abcès au point d'injection a été constatée pour la majorité des souris ; cette observation pourrait s'expliquer par la forte dose de LPS injectée, responsable d'une réaction inflammatoire aiguë et d'une nécrose tissulaire. Epaulard *et al.* avaient déjà remarqué ces abcès lors d'injection de fortes doses de la souche CHA-OST. Nous envisageons d'injecter des doses entre 5.10^7 et 2.10^8 bactéries afin de préciser la tolérance de cette nouvelle souche vectrice.

E. Réponse immunitaire *in vitro*

Contrairement à ce qu'on pouvait supposer, les résultats des tests de présentation d'un antigène par les cellules dendritiques montrent que les bactéries KBMA sont bien capables d'injecter l'antigène dans des cellules dendritiques, de les activer et de générer une réponse

T CD8+ cytotoxique. On retrouve une activation relative des hybridomes B3Z de l'ordre de 60% pour un PCT à 5µM et presque 80% pour un PCT à 2µM.

Ce test n'a été effectué qu'une seule fois sur ce simple mutant *ΔuvrA* et doit être répété afin de vérifier certaines données aberrantes. Cependant, nous pouvons déjà nous satisfaire du rôle de vecteur joué par la souche CHA-OST KBMA capable de générer une réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène *in vitro*, capacité qui sera confirmée ultérieurement sur un double mutant *ΔuvrAB* (article *Molecular Therapy* 2013 en annexe).

F. Réponse immunitaire *in vivo*

Les premiers tests ELISpot ont démontré que la souche KBMA était capable de vectoriser efficacement l'antigène et de générer *in vivo* une réponse T CD8+ vis-à-vis d'un antigène spécifique. Des résultats comparables à la souche parentale ont été obtenus pour des injections à doses élevées de bactéries KBMA, mais avec des valeurs très hétérogènes d'un animal à l'autre. Nous avons quelques difficultés à expliquer cette variabilité élevée dans les réponses immunes. Elle pourrait peut-être s'expliquer par une injection sous-cutanée peu reproductible (opérateur débutant...). Les derniers tests avec des doses injectées de l'ordre de $2 \cdot 10^8$ bactéries ont donné une forte réponse immunitaire vis-à-vis de l'antigène, et ce sur les 3 souris injectées.

Globalement, les données obtenues lors des expériences *in vivo* sont encourageantes : nous avons réussi à diminuer la toxicité de la souche tout en conservant une réponse immune vis-à-vis de l'antigène vectorisé. Il faudra réitérer ces expériences à l'avenir et apporter la preuve de l'efficacité de ce nouveau vecteur dans le cadre d'un challenge tumoral (modèle de mélanome B16 exprimant l'ovalbumine).

G. Perspectives

Nous avons démontré lors de ce travail que le concept d'un vaccin KBMA était applicable à la bactérie *P. aeruginosa*. L'originalité se situe dans la démonstration de la fonctionnalité du système de sécrétion de type III de la bactérie après traitement photochimique, et son utilisation comme vecteur d'antigène. Les travaux effectués par Lankowski *et al.* sur

Salmonella tiphymurium s'intéressaient non pas à l'utilisation de la souche KBMA comme vecteur d'antigène mais plutôt comme vaccin anti-infectieux incapable d'infecter l'hôte, sans se soucier du SSTT de la bactérie (78).

Plusieurs expériences nécessitent d'être reproduites et confirmées, et seules l'élaboration du mutant ainsi que la mise au point du traitement photochimique ont fait l'objet d'une validation scientifique (expériences réalisées plusieurs fois avec une étude statistique).

A la suite de ce travail, de multiples investigations ont été menées par notre équipe et ont conduit à la publication d'un brevet international (PCT EP2012/075167 intitulé « *Attenuated and adapted strain of P. aeruginosa for delivering antigens* »), à un accord de licence entre la start-up APCure, créée en mars 2012, et l'université Joseph Fourier, et enfin à la parution d'un article dans le journal *Molecular Therapy*, le 26 mars 2013 (en annexe).

A partir des expériences concluantes obtenues avec le vecteur *Listeria* KBMA, une plateforme a été créée par l'entreprise AduroBiotech (www.adurobiotech.com) qui développe des immunothérapies antitumorales basées, entre autres, sur l'utilisation du vecteur bactérien *L. monocytogenes*. Plusieurs essais cliniques sont en cours avec *L. monocytogenes* atténuée (souche avec de multiples délétions de gènes) dans le cancer du pancréas, le mélanome et le glioblastome. Pour le moment aucune souche KBMA n'a fait l'objet d'une étude de phase I.

Il se pose certainement le problème de l'industrialisation d'un médicament KBMA stable dont la formulation et la conservation doivent être optimisées (lyophilisation ?) et dont le procédé de production doit être amélioré, afin de le rendre plus reproductible.

CONCLUSION

THESE SOUTENUE PAR : Xavier CHAUCHET

TITRE : Immunothérapie anti-tumorale active par vecteur bactérien vivant atténué : mise au point de l'approche « Killed But Metabolically Active Vaccine »

CONCLUSION

La récente mise sur le marché du sipuleucel-T (Provenge®, Dendreon corp.) démontre l'intérêt de l'immunothérapie active et spécifique dans le traitement du cancer. Ce traitement consiste à prélever et éduquer les cellules dendritiques du patient contre un antigène de tumeur défini, puis de les réinjecter pour obtenir une réponse du système immunitaire contre la tumeur. Toutefois, il s'agit d'une technologie complexe, nécessitant la manipulation *ex vivo* des cellules dendritiques, et extrêmement coûteuse (70 000€ le traitement en 2012).

La vectorisation de l'antigène et l'activation des cellules dendritiques (plus généralement des cellules présentatrices d'antigènes) *in vivo* constitue une stratégie d'avenir beaucoup plus simple à mettre en place, moins lourde pour le patient et nettement moins onéreuse. Différents moyens pour vectoriser l'antigène ont été développés ces dernières années et il semble que les vecteurs bactériens atténués répondent aux prérequis pour obtenir une réponse efficace. Ils stimulent l'immunité innée, en créant une réaction inflammatoire locale (au point d'injection), et l'immunité adaptative en activant les cellules dendritiques, tout en délivrant l'antigène. Le laboratoire TheREx a développé une souche de *Pseudomonas aeruginosa* fortement atténuée capable de générer ce type de réponse immunitaire. L'antigène tumoral est injecté directement dans le cytoplasme des cellules présentatrices d'antigènes par le système de sécrétion de type III de la bactérie, favorisant ainsi une présentation aux lymphocytes T CD8+, via le CMH I.

Néanmoins, pour pallier les risques de dissémination de germes atténués dans l'environnement et dans le cas d'une administration future chez l'homme, il est nécessaire de sécuriser l'utilisation de ce type de vecteur.

Au cours de ce travail nous avons mis au point une seconde génération de vecteur en utilisant un concept de vaccins innovants contenant des micro-organismes « tués mais métaboliquement actifs » (KBMA). Le procédé de production consiste dans un premier temps à inactiver l'exonuclease ABC, intervenant dans la réparation des lésions UV-induites sur l'ADN, par une délétion du gène codant pour la sous-unité A de l'enzyme. Les bactéries mutées sont ensuite soumises à un traitement photochimique justement dosé pour former des pontages covalents dans l'ADN, permettant d'abolir la réplication et la prolifération bactérienne, tout en conservant en grande partie l'expression du génome et du protéome. On obtient ainsi une souche vaccinale métaboliquement active, capable de jouer son rôle de vecteur, et présentant l'innocuité d'un vaccin inactivé.

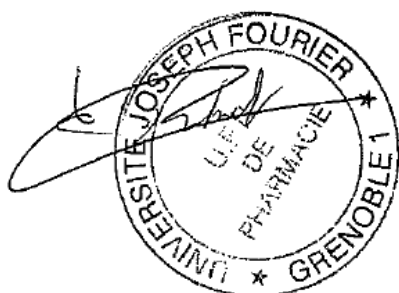
Ces étapes ont été effectuées avec succès et nous avons pu démontrer *in vitro* et *in vivo* que cette nouvelle souche vaccinale conservait une bonne efficacité tout en bloquant sa réplication. Nous avons pu injecter à des souris des doses 10 fois supérieures à celles de la souche parentale sans observer de symptômes particuliers.

Ces données encourageantes ouvrent une nouvelle piste pour le développement d'un vecteur bactérien dépourvu de risques, toujours capable de stimuler l'immunité et dont la production est particulièrement aisée.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 25/4/2013

LE DOYEN



Professeur Christophe RIBUOT

LE PRESIDENT DE LA THESE

A handwritten signature of Michel SEVE.

Professeur Michel SEVE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Apr;61(2):69–90.
2. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012 Oct;62(5):309–35.
3. Coley WB. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc. R. Soc. Med.* 1910;3(Surg Sect):1–48.
4. Cheever MA, Higano CS. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin. Cancer Res.* 2011 Jun 1;17(11):3520–6.
5. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 2010 Jul 29;363(5):411–22.
6. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011 Mar 25;331(6024):1565–70.
7. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* 2011 Dec 22;480(7378):480–9.
8. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245–52.
9. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 2005 Apr;5(4):296–306.
10. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 2007 Sep 27;449(7161):419–26.
11. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* 2010 Mar;234(1):45–54.
12. Liu Y-J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23:275–306.
13. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer.* 2012 Apr;12(4):265–77.
14. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996 Sep 20;86(6):973–83.
15. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology.* 2004 Jul;4(7):499–511.
16. Medzhitov R. TOLL-LIKE RECEPTORS AND INNATE IMMUNITY. *Nature Reviews Immunology.* 2001 Nov;1(2):135–45.
17. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2004 Oct;5(10):987–95.
18. Seong S-Y, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2004 Jun;4(6):469–78.
19. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology.* 2006 May 8;6(6):476–83.
20. Ueno H, Klechevsky E, Schmitt N, Ni L, Flamar A-L, Zurawski S, et al. Targeting human dendritic cell subsets for improved vaccines. *Semin. Immunol.* 2011 Feb;23(1):21–7.

21. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23:975–1028.
22. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2012 Aug;12(8):557–69.
23. O’Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science.* 2010 Feb 26;327(5969):1098–102.
24. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood.* 2013 Jan 16;
25. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 2007 Feb;13(2):139–45.
26. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2010 Apr;10(4):248–56.
27. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity.* 2009 Mar 20;30(3):324–35.
28. Laurent C, Fazilleau N, Brousset P. A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers. *Haematologica.* 2010 Mar;95(3):356–8.
29. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity.* 2008 Jul 18;29(1):138–49.
30. Savage PA, Malchow S, Leventhal DS. Basic principles of tumor-associated regulatory T cell biology. *Trends Immunol.* 2013 Jan;34(1):33–40.
31. Finn OJ. Cancer immunology. *N. Engl. J. Med.* 2008 Jun 19;358(25):2704–15.
32. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* 2002 Jun;2(6):401–9.
33. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;20:323–70.
34. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 2013 Mar 8;
35. Sharma P, Wagner K, Wolchok JD, Allison JP. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat. Rev. Cancer.* 2011 Nov;11(11):805–12.
36. Zitvogel L, Kroemer G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2012 Nov 1;1(8):1223–5.
37. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010 Aug 19;363(8):711–23.
38. Buonaguro L, Petrizzo A, Ternesello ML, Buonaguro FM. Translating tumor antigens into cancer vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011 Jan;18(1):23–34.
39. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991 Dec 13;254(5038):1643–7.
40. Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.* 2005 Mar;54(3):187–207.
41. Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *J. Immunol.* 2007 Feb 15;178(4):1975–9.

42. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.* 2009 Sep 1;15(17):5323–37.
43. Srivastava PK, Amato RJ. Heat shock proteins: the “Swiss Army Knife” vaccines against cancers and infectious agents. *Vaccine.* 2001 Mar 21;19(17-19):2590–7.
44. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 2002 Apr 26;277(17):15028–34.
45. Tacke PJ, de Vries IJM, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat. Rev. Immunol.* 2007 Oct;7(10):790–802.
46. Fioretti D, Iurescia S, Rinaldi M. Recent Advances in Design of Immunogenic and Effective Naked DNA Vaccines against Cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2013 Feb 25;
47. Anderson RJ, Schneider J. Plasmid DNA and viral vector-based vaccines for the treatment of cancer. *Vaccine.* 2007 Sep 27;25 Suppl 2:B24–34.
48. Kroemer G, Zitvogel L, Galluzzi L. Victories and deceptions in tumor immunology: Stimuvax®. *Oncoimmunology.* 2013 Jan 1;2(1):e23687.
49. Cawood R, Hills T, Wong SL, Alamoudi AA, Beadle S, Fisher KD, et al. Recombinant viral vaccines for cancer. *Trends Mol Med.* 2012 Sep;18(9):564–74.
50. Madan RA, Bilusic M, Heery C, Schlom J, Gulley JL. Clinical evaluation of TRICOM vector therapeutic cancer vaccines. *Semin. Oncol.* 2012 Jun;39(3):296–304.
51. Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2010 Nov;10(11):785–94.
52. Le Gouvellec A, Chauchet X, Polack B, Buffat L, Toussaint B. Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages. *Hum Vaccin Immunother.* 2012 Oct 1;8(10):1454–8.
53. Hu PQ, Tuma-Warrino RJ, Bryan MA, Mitchell KG, Higgins DE, Watkins SC, et al. Escherichia coli expressing recombinant antigen and listeriolysin O stimulate class I-restricted CD8+ T cells following uptake by human APC. *J. Immunol.* 2004 Feb 1;172(3):1595–601.
54. Guirnalda P, Wood L, Paterson Y. Listeria monocytogenes and its products as agents for cancer immunotherapy. *Adv. Immunol.* 2012;113:81–118.
55. Rüssmann H, Shams H, Poblete F, Fu Y, Galán JE, Donis RO. Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. *Science.* 1998 Jul 24;281(5376):565–8.
56. Hegazy WAH, Xu X, Metelitsa L, Hensel M. Evaluation of Salmonella enterica type III secretion system effector proteins as carriers for heterologous vaccine antigens. *Infect. Immun.* 2012 Mar;80(3):1193–202.
57. Shahabi V, Maciag PC, Rivera S, Wallecha A. Live, attenuated strains of Listeria and Salmonella as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng Bugs.* 2010 Aug;1(4):235–43.
58. Cornelis GR. The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006 Nov;4(11):811–25.
59. Galán JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature.* 2006 Nov 30;444(7119):567–73.
60. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998 Jun;62(2):379–433.

61. Frank DW, Iglewski BH. Cloning and sequence analysis of a trans-regulatory locus required for exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1991 Oct;173(20):6460–8.
62. Frithz-Lindsten E, Du Y, Rosqvist R, Forsberg A. Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. *Mol. Microbiol.* 1997 Sep;25(6):1125–39.
63. Epaulard O, Toussaint B, Quenee L, Derouazi M, Bosco N, Villiers C, et al. Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system-based vector. *Mol. Ther.* 2006 Nov;14(5):656–61.
64. Vance RE, Rietsch A, Mekalanos JJ. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect. Immun.* 2005 Mar;73(3):1706–13.
65. Dacheux D, Goure J, Chabert J, Usson Y, Attree I. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol. Microbiol.* 2001 Apr;40(1):76–85.
66. Dacheux D, Attree I, Schneider C, Toussaint B. Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect. Immun.* 1999 Nov;67(11):6164–7.
67. Dacheux D, Toussaint B, Richard M, Brochier G, Croize J, Attree I. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 2000 May;68(5):2916–24.
68. Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS, Lory S. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell.* 2004 Nov;7(5):745–54.
69. Hovey AK, Frank DW. Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J. Bacteriol.* 1995 Aug;177(15):4427–36.
70. Quéneé L, Lamotte D, Polack B. Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques.* 2005 Jan;38(1):63–7.
71. Epaulard O, Derouazi M, Margerit C, Marlu R, Filopon D, Polack B, et al. Optimization of a type III secretion system-based *Pseudomonas aeruginosa* live vector for antigen delivery. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008 Feb;15(2):308–13.
72. Derouazi M, Wang Y, Marlu R, Epaulard O, Mayol J-F, Pasqual N, et al. Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector: application to TRP-2. *Bioeng Bugs.* 2010 Feb;1(1):51–60.
73. Wang Y, Gouëllec AL, Chaker H, Asrih H, Polack B, Toussaint B. Optimization of antitumor immunotherapy mediated by type III secretion system-based live attenuated bacterial vectors. *J. Immunother.* 2012 Apr;35(3):223–34.
74. Alexander J, Sidney J, Southwood S, Ruppert J, Oseroff C, Maewal A, et al. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity.* 1994 Dec;1(9):751–61.

75. Wollowitz S. Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. *Semin. Hematol.* 2001 Oct;38(4 Suppl 11):4–11.
76. Dubensky TW Jr, Skoble J, Lauer P, Brockstedt DG. Killed but metabolically active vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012 Dec;23(6):917–23.
77. Brockstedt DG, Bahjat KS, Giedlin MA, Liu W, Leong M, Lockett W, et al. Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. *Nat. Med.* 2005 Aug;11(8):853–60.
78. Lankowski AJ, Hohmann EL. Killed but metabolically active *Salmonella typhimurium*: application of a new technology to an old vector. *J. Infect. Dis.* 2007 Apr 15;195(8):1203–11.
79. Skoble J, Beaber JW, Gao Y, Lovchik JA, Sower LE, Liu W, et al. Killed but metabolically active *Bacillus anthracis* vaccines induce broad and protective immunity against anthrax. *Infect. Immun.* 2009 Apr;77(4):1649–63.
80. Van Houten B, Croteau DL, DellaVecchia MJ, Wang H, Kisker C. “Close-fitting sleeves”: DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system. *Mutat. Res.* 2005 Sep 4;577(1–2):92–117.
81. Skoberne M, Yewdall A, Bahjat KS, Godefroy E, Lauer P, Lemmens E, et al. KBMA *Listeria monocytogenes* is an effective vector for DC-mediated induction of antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* 2008 Dec;118(12):3990–4001.
82. Detmer A, Glenting J. Live bacterial vaccines—a review and identification of potential hazards. *Microb. Cell Fact.* 2006;5:23.
83. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 2000 Aug 31;406(6799):959–64.
84. Marx CJ, Lidstrom ME. Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *BioTechniques.* 2002 Nov;33(5):1062–7.
85. Malarkannan S, Mendoza LM, Shastri N. Generation of antigen-specific, lacZ-inducible T-cell hybrids. *Methods Mol. Biol.* 2001;156:265–72.
86. Sancar A, Sancar GB. DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 1988;57:29–67.
87. Gordienko I. A specific 3′ exonuclease activity of UvrABC. *The EMBO Journal.* 1998 Jan 15;17(2):626–33.



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

ANNEXES

- Article publié dans *Molecular Therapy* : “ A safe bacterial microsyringe for *in vivo* antigen delivery and immunotherapy “. Accepté le 30 janvier 2013

© The American Society of Gene & Cell Therapy

original article

A Safe Bacterial Microsyringe for *In Vivo* Antigen Delivery and Immunotherapy

Audrey Le Gouëllec^{1,4}, Xavier Chauchet¹, David Laurin^{1,2}, Caroline Aspord^{2,3}, Julien Verove⁶, Yan Wang¹, Charlotte Genestet¹, Candice Trocme⁴, Mitra Ahmadi⁵, Sandrine Martin⁵, Alexis Broisat⁵, François Cretin⁶, Catherine Ghezzi⁵, Benoit Polack^{1,7}, Joël Plumas^{2,3} and Bertrand Toussaint^{1,4}

- Commentaire publié dans *Human Vaccines & Immunotherapeutics* : “Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages”. Accepté le 7 octobre 2012

Human Vaccines & Immunotherapeutics 8:10, 1-5; October 2012; © 2012 Landes Bioscience

COMMENTARY

Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages

Audrey Le Gouëllec¹, Xavier Chauchet¹, Benoit Polack¹, Laurent Buffat² and Bertrand Toussaint^{1,*}

¹Faculté de Médecine; Université Joseph Fourier; Grenoble, France; ²APCure SAS; Lyon, France